

Mitochondrienfunktion und Adeninnukleotidgehalt
des Gehirns in Abhängigkeit von der Ischämiedauer

von

Rolf Nitsche

aus

Ansbach

1984

Diss. Erlangen

1984 № 147





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Physiologische Chemie

der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Prof. Dr. med. Karl Brand

Mitochondrienfunktion und Adeninnukleotidgehalt des Gehirns in Abhängigkeit von der Ischämiedauer

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Friedrich - Alexander - Universität

Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Rolf Nitsche

aus

Ansbach

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. F. Wolf

Referent: Prof. Dr. K. Brand

Tag der mündlichen Prüfung: 13.02.1984

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1. Einführung und Problemstellung	1
2. Material und Methoden	4
2.1 Chemikalien	4
2.2 Versuchstiere	5
2.3 Narkose - Ischämie - Hirnpräparation	6
2.4 Untersuchung der Mitochondrienfunktion	6
2.4.1 Präparation der Mitochondrien	7
2.4.2 Sauerstoffmessung	9
2.4.2.1 Definition der Zustände mitochondrialer Atmung	9
2.4.2.2 Meßelektrode	10
2.4.2.3 Versuchsdurchführung	11
2.4.3 ATP-Bestimmung	13
2.4.4 Proteinbestimmung	15
2.4.5 Funktionsparameter	17
2.5 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Mitochondrienstruktur	18
2.6 Untersuchung des Adeninnukleotidgehalts im Rattenhirn	19
2.6.1 Präparation	19
2.6.2 Enzymatische Bestimmung	21
2.6.3 Berechnung des "Energy charge"	22
2.7 Statistische Methoden	23
3. Ergebnisse	24
3.1 Mitochondrienfunktion: Sauerstoffverbrauchs- raten, ATP-Bildungsraten und Atmungskontroll- quotienten in Abhängigkeit von der Ischämie- dauer	24
3.1.1 Sauerstoffverbrauchsraten	24
3.1.2 ATP-Bildungsraten	25

3.1.3 Vergleich von Sauerstoffverbrauchsrate und ATP-Bildungsrate	26
3.2 Mitochondrienmorphologie nach 0 min und 20 min Ischämie	35
3.3 Adeninnukleotidkonzentrationen im Rattenhirn in Abhängigkeit von der Ischämiedauer	38
4. Diskussion	44
4.1 Diskussion der Versuche zur Auswirkung der Ischämie auf den Adeninnukleotidgehalt	44
4.2 Diskussion der Versuche zur Auswirkung der Ischämie auf die Mitochondrienstruktur	48
4.3 Diskussion der Versuche zur Auswirkung der Ischämie auf die Mitochondrienfunktion	50
5. Zusammenfassung	57
6. Appendix	59
7. Literaturverzeichnis	72

A B K Ü R Z U N G E N

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adosintriphosphat
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Riboflavin-5'-phosphat
LDH	Lactatdehydrogenase
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH ₂	reduziertes NAD
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADPH ₂	reduziertes NADP
PCA	Perchlorsäure
PEP	Phosphoenolpyruvat
RCR	Atmungskontrollquotient
TCA	Trichloressigsäure
Tra	Triäthanolamin-Hydrochlorid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

1. EINFÜHRUNG

UND PROBLEMSTELLUNG

Als Ischämie wird die verminderte Durchblutung eines Organes oder Organbezirktes infolge einer herabgesetzten Blutzufuhr bezeichnet. Bei dem stärksten Grad einer Ischämie besteht eine vollkommene Blutleere. Die Ischämie wird in der Regel örtlich durch Einengung oder Verschluss einer Arterie verursacht (Thrombose, Embolie, Arteriosklerose, Angiospasmus, Ligatur, Torsion ...). In seltenen Fällen kann sie auch durch eine allgemeine Störung hervorgerufen werden (Hypovolämie, Schock, Asystolie ...). Bei Herzoperationen lassen sich kurzfristige und bei Transplantationen langfristige Ischämien nicht vermeiden. Die Folgen einer Ischämie hängen von der Dauer, der Empfindlichkeit des Gewebes und der Gefäßarchitektur ab. Eine Minderdurchblutung des Gehirns äußert sich klinisch als Apoplexia cerebri (1).

Jede Zelle braucht nicht nur für ihre Funktionen, sondern allein schon zum Erhalt ihrer Strukturen ständig Energie. Die Nervenzelle gewinnt ihre Energie normalerweise aus der Oxidation von Glukose mit Hilfe von Sauerstoff. Da weder Glukose noch Sauerstoff von den Nervenzellen gespeichert werden kann, ist das Gehirn auf eine ständige und ausreichende Zufuhr angewiesen. Eine Ischämie führt zur Unterbrechung der Energiezufuhr und damit zur Schädigung und letztlich zum Tod der Zelle (ischämischer Infarkt). Von besonderer Bedeutung ist die Frage, wie lange ein Organ eine Ischämie ohne Schaden überstehen kann. Aus klinischen Beobachtungen ist bekannt, daß das Gehirn in dieser Hinsicht das empfindlichste Organ ist. Nach ca. 6 bis 8 Minuten muß hier mit irreversiblen

Schäden (Nekrosen) gerechnet werden. Dieser Zeitraum ist der limitierende Faktor für alle Wiederbelebungsmaßnahmen. Zahlreiche Arbeiten aus vielen medizinischen Fachgebieten befassen sich mit den Ursachen, den Folgen und der Beeinflußbarkeit einer Ischämie des Gehirns.

Von Seiten der Physiologischen Chemie wurden im Rahmen dieser Problematik insbesondere Untersuchungen über den Energiestoffwechsel des Gehirns und der Nervenzellen durchgeführt. Detaillierte Kenntnisse liegen bereits vor über die Stoffwechselwege und deren enzymatische Regulation. Es finden sich Arbeiten über die Entwicklung des Energiestoffwechsels beim Neugeborenen (2) und über die Einflüsse verschiedener Faktoren wie Pharmaka (vgl. Kapitel 4.3) oder Ionenkonzentrationen (3) auf den Energiestoffwechsel. Als Folge einer Ischämie wurde beispielsweise das Auftreten freier Radikaler nachgewiesen (4;5). Die Konzentrationen von Metaboliten der Glykolyse (6) und des Citratzyklus (7) wurden nach Ischämie ebenso gemessen wie die Konzentrationen von energiereichen Verbindungen und deren Abbauprodukten (vgl. Kapitel 4.1). Als weitere Parameter einer ischämischen Schädigung wurden auch andere zelluläre Funktionen wie etwa Membrantransportvorgänge oder Biosyntheseraten von Zellorganellen untersucht. Das Mitochondrium ist besonders geeignet zur Erfassung ischämischer Schäden, da in diesem Zellorganell der größte Teil des Atmungssauerstoffes zur Energiegewinnung chemisch umgesetzt, d.h. reduziert wird.

Die vorliegende Untersuchung soll zeigen, wie sich eine komplette Ischämie bei 37°C in Abhängigkeit von ihrer Dauer auf die Funktion von Hirnmitochondrien auswirkt. Dazu wurden nach verschiedenen Zeiten totaler Ischämie die Hirnmitochondrien wieder mit allen erforderlichen

Substraten versorgt und die Sauerstoffverbrauchs- und ATP-Bildungsraten der Mitochondrien als Funktionsparameter bestimmt. Zusätzlich zu den Funktionsanalysen wurden auch morphologische Untersuchungen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine Mitochondrienfraktion ohne ischämische Schädigung und zwei Mitochondrienfraktionen nach 20 min Ischämie elektronenmikroskopisch untersucht. Neben der Qualitätskontrolle für den Präparationsvorgang wurde damit ein Vergleich zwischen funktionellen und morphologischen ischämiebedingten Veränderungen möglich.

Eine der wichtigsten Aufgaben der Mitochondrien ist die Synthese von ATP, das seinerseits für praktisch alle energieabhängigen Zellfunktionen als Energiequelle dient. Zur Charakterisierung der energetischen Situation im Gehirn wurden die Konzentrationen von ATP, ADP und AMP nach unterschiedlicher Ischämiedauer bestimmt.

Die experimentellen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß Hirnmitochondrien von Ratten nach etwa 10 min Ischämie funktionell erheblich geschädigt sind, während die intrazelluläre ATP-Menge schon nach wenigen Minuten völlig aufgebraucht ist.

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines Forschungsprojektes, im Rahmen dessen die Mitochondrienfunktion und der Adeninukleotidgehalt in Abhängigkeit von der Ischämiedauer in den Organen Hirn, Herz, Leber und Niere von Ratten unterschiedlichen Lebensalters untersucht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien

Für alle Messungen wurden im Handel erhältliche, für biochemische Zwecke geeignete Enzyme und Reagentien mit dem notwendigen Reinheitsgrad verwendet. Es stammten

von der Firma E. Merck, Darmstadt:

Äpfelsäure (=Malat)
 Glukose
 Glutaminsäure
 Kaliumchlorid (KCl)
 Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)
 Kaliumhydroxyd (KOH)
 Kalium-Natrium-Tartrat
 Kupfer-(II)-sulfat (CuSO_4)
 Magnesiumchlorid (MgCl_2)
 Magnesiumsulfat (MgSO_4)
 Mannitol
 Natriumdithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)
 Perchlorsäure (=PCA)
 Phenolphthalein
 Saccharose

von der Firma Carl Roth, Karlsruhe:

K^+ -EDTA
 Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (=Tris)

von der Firma Serva, Heidelberg:

Succinat- Na_2 -Salz

von der Firma Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala Schweden:
Ficoll 400

von der Firma Boehringer, Mannheim:

ADP

Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (1mg/ml)

Hexokinase (10mg/ml)

Lactatdehydrogenase (10mg/ml)

Myokinase (5mg/ml)

NAD

NADP

Phosphoenolpyruvat (=PEP)

Pyruvatkinase (Suspension; 10mg/ml)

Triäthanolamin-Hydrochlorid (=Tra)

Trichloressigsäure (=TCA)

von der Firma ICN-K&K Laboratories, New York:

Rotenone

2.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche Sprague-Dawley Ratten der Firmen Gassner, Sulzfeld, und Dr. Ivanovas, Kißlegg/Allgäu, mit einem Körpergewicht zwischen 200g und 250g, was einem Alter von 8 bis 10 Wochen entsprach. Gefüttert wurde mit Altromin Standard-Diät Ratten-Mäuse und Leitungswasser ad libitum.

2.3 Narkose - Ischämie - Hirnpräparation

Nach dem Wiegen wurde die Ratte in einem geschlossenen Behälter (ca. 33 l) einige Minuten mit ca. 20 ml Äther betäubt bis das Toleranzstadium (Pupillenweite, Cornealreflex, Muskeltonus) erreicht war. Es fiel eine gewisse individuelle Streubreite hinsichtlich der nötigen Äthermenge und Einwirkungszeit auf.

Die Ischämie des Gehirns wurde durch ein vollständiges Abtrennen des Herzens von den großen Gefäßen erreicht. Für die Dauer der Ischämie befand sich das Tier, durch einen Plastikbeutel trocken gehalten, in einem Wasserbad von 37°C. Bei den Kontrolltieren ohne Ischämie wurde das Gehirn in Narkose ohne Eingriff am Herzen sofort präpariert.

Für die Präparation des Gehirns wurde zunächst im Nacken transversal und auf dem Schädel median sagittal bis zur Grenze des Neurocraniums die Haut T-förmig durchtrennt und die Hautzipfel mobilisiert. Die Nackenmuskulatur wurde bis auf die Wirbelsäule transversal durchschnitten. Mit einer Schere wurde nun oberhalb des Cerebellums median eingestochen und das Schädeldach dem Hautschnitt folgend gespalten. Anschließend wurde mit der Schere als Hebel der Knochen nach beiden Seiten aufgeklappt und das Gehirn ohne Kleinhirn und Rückenmark entnommen.

2.4 Untersuchung der Mitochondrienfunktion

Die Funktion der Mitochondrien in Abhängigkeit von der Ischämiedauer wurde durch Messung der Sauerstoffverbrauchs- und ATP-Bildungsraten von Mitochondrien aus 6 Versuchstieren pro Ischämiezeit bestimmt. Die untersuchten Ischämiezeiten waren 0 min, 5 min, 10 min und 20 min.

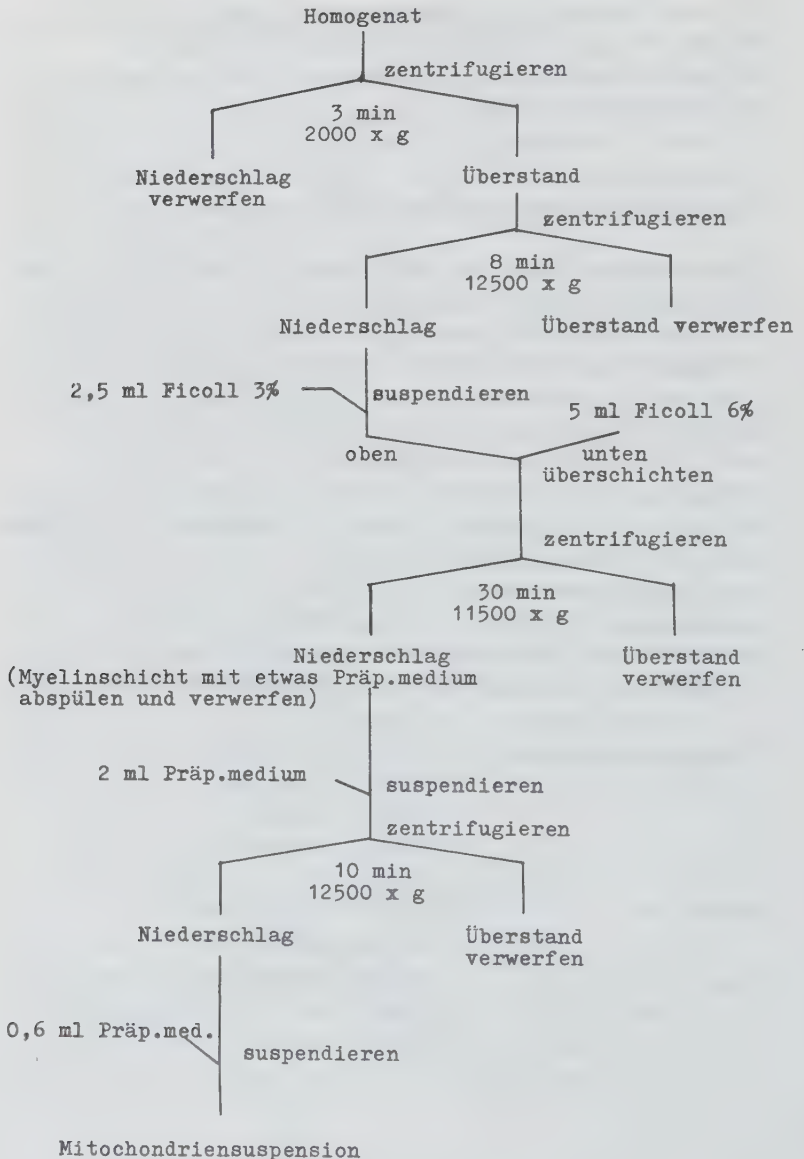
Mit der Mitochondrienpräparation aus einem Rattenhirn wurden für jedes Atmungskettensubstrat (Malat bzw. Succinat) jeweils zwei Sauerstoffmessungen durchgeführt und die Werte gemittelt.

2.4.1 Präparation der Mitochondrien

Die Präparation erfolgte weitgehend nach der Methode von Clark und Nicklas (8). Das gewonnene Hirn wurde sofort in eiskaltes Präparationsmedium gegeben. Soweit nicht anders erwähnt erfolgten alle Arbeiten im Kühlraum (4°C) oder auf Eis. Die Zentrifuge (Cryofuge 20-3 der Firma Heraeus Christ, Rotor 08780) war stets auf 4°C vorgekühlt. Das Hirn wurde fein zerschnitten, von Blut und Gerinnungsprodukten gereinigt und das Volumen durch Verdrängung in 6 ml Präparationsmedium bestimmt. Anschließend wurde mit einem vorgekühlten Glas-Teflon-Homogenisator nach Potter Elvehjem bei 80 Umdrehungen pro Minute durch achtmaliges vollständiges Aufundabbewegen des Glases homogenisiert. Die Mitochondriensuspension wurde durch fraktionierte Zentrifugation gewonnen (siehe Schema).

Präparationsmedium:	250 mM	Saccharose
	10 mM	Tris
	0,5mM	K ⁺ -EDTA
	pH 7,4	(eingestellt mit HCl)

Ficoll 3% :	3% (w/v)	Ficoll 400
	120 mM	Mannitol
	30 mM	Saccharose
	0,025 mM	K ⁺ -EDTA
	pH 7,4	

Schema der Mitochondrienpräparation:

Ficoll 6% : 6% (w/v) Ficoll 400
 240 mM Mannitol
 60 mM Saccharose
 0,05 mM K^+ -EDTA
 pH 7,4

2.4.2 Sauerstoffmessung

Zur Messung der Sauerstoffverbrauchsrate wurden die Mitochondrien mit verschiedenen Substraten (Malat bzw. Succinat) bei 25°C inkubiert und dabei fortlaufend die Sauerstoffkonzentration bestimmt.

2.4.2.1 Definition der Zustände mitochondrialer Atmung

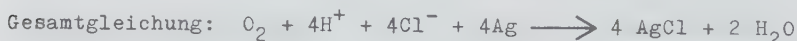
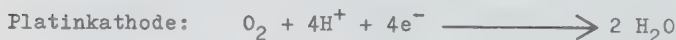
Chance und Williams haben 1955 folgende Zustände mitochondrialer Atmung ("states") definiert (9), auf die im weiteren Text Bezug genommen wird:

	state 1	state 2	state 3	state 4	state 5
Charakteristikum	aerob	aerob	aerob	aerob	anaerob
ADP-Spiegel	nieder	hoch	hoch	nieder	hoch
Substrat-Spiegel	nieder	fast null	hoch	hoch	hoch
	endogen				
Atmungsrate	langsam	langsam	schnell	langsam	null
limitierende Komponente	Phosphat-akzeptor	Substrat	Atmungskette	Phosphat-akzeptor	Sauerstoff

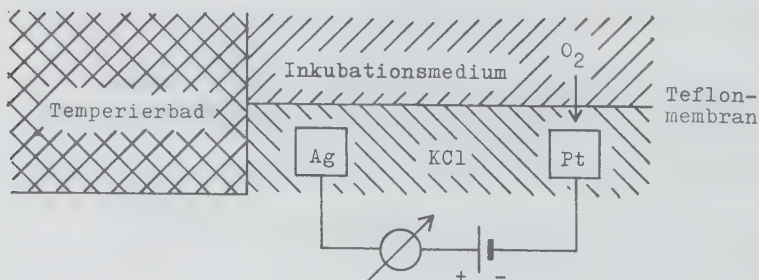
"state 3" wird auch aktivierter und "state 4" kontrollierter Zustand genannt.

2.4.2.2 Meßelektrode

Die Sauerstoffelektrode Hansatech der Firma Bachhofer, Reutlingen, reduziert geringe Mengen Sauerstoff aus dem Inkubationsmedium. Die dabei fließende Stromstärke ist der Sauerstoffkonzentration proportional und wird mit Hilfe eines Potentiometerschreibers linear gegen die Zeit aufgetragen. Zur Eichung der Skala dient der Nullwert nach Reduktion des gesamten Sauerstoffs durch einen Überschuß des Reduktionsmittels Natriumdithionit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, sowie der Sättigungswert für Sauerstoff in Wasser bei 25°C (253 nmol Sauerstoff pro ml Wasser) (10). Das Inkubationsmedium wird dabei ständig von einem Magnetrührer durchmischt und mit einem Wassermantel auf 25°C gehalten. Die beiden Elektroden sind von gesättigter Kaliumchloridlösung umgeben und von dem Inkubationsmedium durch eine Teflonmembran getrennt, durch die der Sauerstoff hindurch diffundiert.



Schema der Meßelektrode:



2.4.2.3 Versuchsdurchführung

In das Inkubationsgefäß der Meßelektrode wurden in Abständen nacheinander folgende Lösungen pipettiert und dabei laufend die Sauerstoffkonzentration des Inkubationsansatzes aufgezeichnet.

- | | | |
|----|---|-----------|
| a) | Inkubationsmedium von 25°C
variiert nach Clark und Nicklas (8)
225 mM Mannitol
75 mM Saccharose
15 mM Tris
5 mM KH_2PO_4
0,05 mM K^+ -EDTA
pH 7,4 | 2,00 ml |
| b) | Rotenone 1 mM in Äthanol
wurde nur bei Verwendung von Succinat als
Substrat zugegeben | (0,01 ml) |
| c) | Mitochondriensuspension
ca. 7 mg Protein pro ml; die exakte Konzentration
wurde bei jedem Versuch extra bestimmt | 0,10 ml |
| d) | Substratlösung
aa) Malat / Glutamat je 0,5 M pH 7,4
bb) Succinat 1 M pH 7,4 | 0,02 ml |
| e) | ADP-Lösung 35 mM pH 7,4 | 0,01 ml |

Rotenone blockiert die Atmungskette zwischen FMN und Ubichinon (11); dadurch kann nur noch Wasserstoff, der über das Coenzym FAD (z.B. vom Succinat) einfließt, oxidiert werden, während Wasserstoff, der über das

Cosubstrat NAD einfließt (z.B. vom Malat) nicht weiter oxidiert werden kann. Die Zugabe von Rotenone erschien notwendig, weil als Folge der Succinatmetabolisierung im Citratzyklus Malat entsteht, das seinerseits als Wasserstoffdonator für die Atmungskette fungiert und somit die Meßwerte verfälscht hätte.

Durch die Zugabe der Mitochondrien beginnt ein langsamer Sauerstoffverbrauch ("state 1" nach Chance und Williams), der sich durch Zusatz des jeweiligen Substrates vergrößert ("state 4"). Das Gleichgewicht der Reaktion



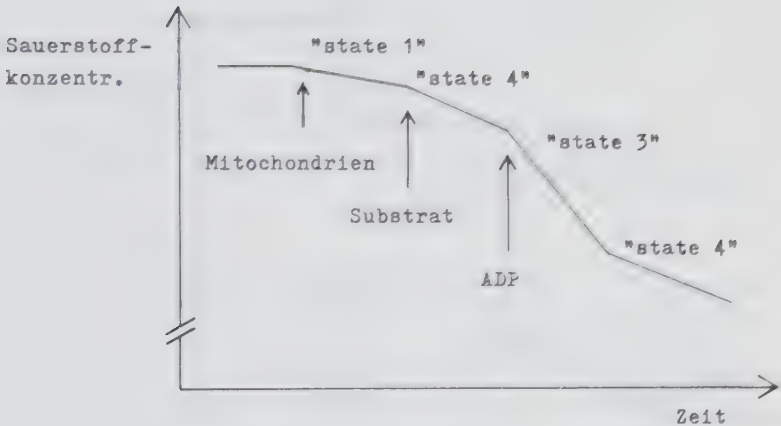
begünstigt die linke Seite der Reaktionsgleichung (12); deshalb wurde Glutamat in die Malatlösung gegeben, um mit Hilfe der Transaminierung



zu verhindern, daß das Substrat zum begrenzenden Faktor der mitochondrialen Atmung wird.

ADP aktiviert nun deutlich die Atmung intakter Mitochondrien ("state 3"). Die zugegebene Menge von 350 nmol war so bemessen, daß ihr vollständiger Umsatz zu ATP abgewartet werden konnte, wonach der Sauerstoffverbrauch wieder deutlich zurückgeht ("state 4").

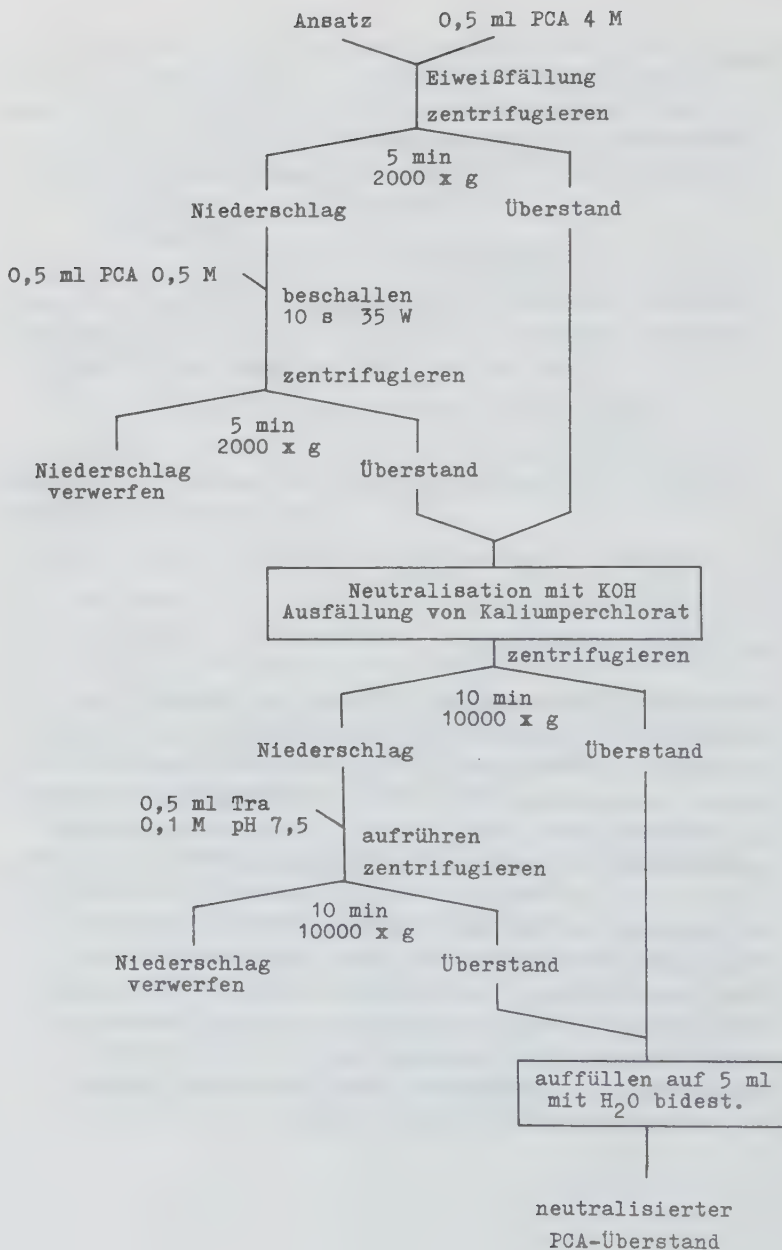
Abb. 1 zeigt schematisch den zeitlichen Verlauf der Sauerstoffkonzentration im Inkubationsgefäß, wie er vom Potentiometerschreiber aufgezeichnet wurde.

Abb. 1

2.4.3 ATP - Bestimmung

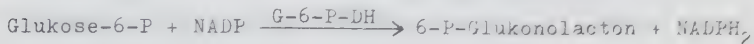
Vorversuche hatten ergeben, daß nach dem Übergang vom aktivierten zum kontrollierten Zustand nicht die gesamte eingesetzte ADP-Menge zu ATP umgesetzt ist; deshalb erschien es notwendig, die gewonnene ATP-Menge enzymatisch zu bestimmen. Dazu wurde nach der Sauerstoffmessung der Ansatz gemäß dem nachfolgenden Schema bei 4°C aufbereitet.

Der erreichte pH-Wert wurde laufend kontrolliert. Die Beschallung erfolgte mit dem Gerät "Sonifier B-12" der Firma Branson Sonic Power Company. Falls der ATP-Gehalt erst am nächsten Tag gemessen werden konnte, wurden die neutralisierten PCA-Überstände bis dahin auf -28°C eingefroren; die Haltbarkeit unter diesen Bedingungen war in Vorversuchen überprüft worden.



Die enzymatisch-optische Messung am Photometer PM4 der Firma Carl Zeiss erfolgte bei der Wellenlänge 340 nm in einer 2 cm Halbmicroküvette nach folgendem Schema:

Reaktionsweg:



Pipettierplan:

Neutralisierter PCA-Überstand	1,000 ml
Tris 1 M pH 7,6	0,050 ml
MgCl ₂ 0,1 M	0,050 ml
NADP 0,01 M	0,050 ml
Glukose 0,05 M	0,050 ml
G-6-P-DH	0,010 ml
Hexokinase	0,010 ml

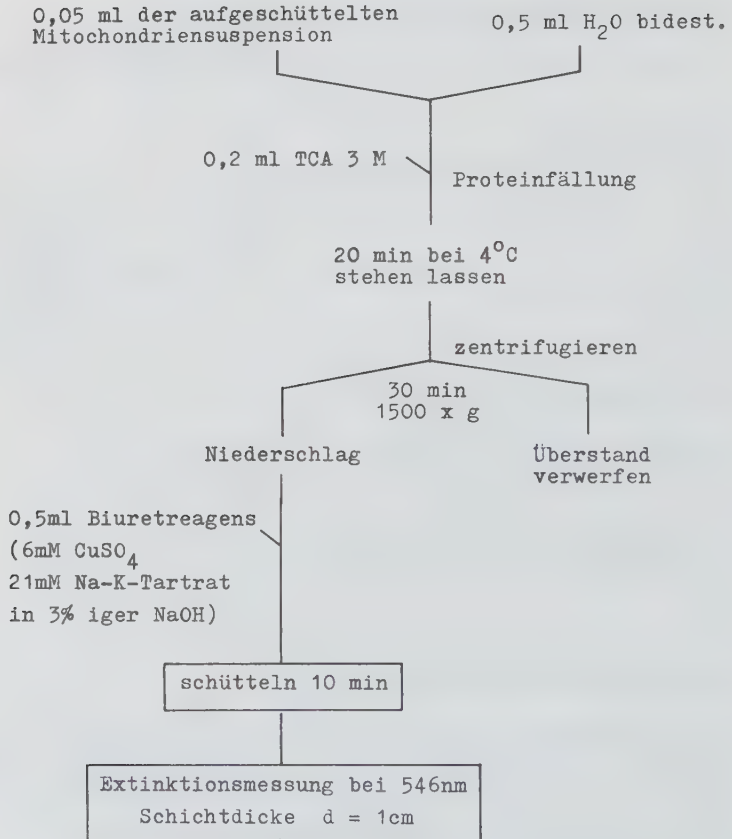
$$\text{Berechnung: } [\text{ATP}] = \Delta E \cdot \frac{\text{mmol}}{6,3 \text{ l}} \cdot \frac{\text{cm}}{2 \text{ cm}} \cdot \frac{1,22 \text{ ml}}{1,06 \text{ ml}} \cdot 5,0 \text{ ml}$$

Die Eigenextinktion der Hexokinase wurde dabei extra bestimmt und von ΔE abgezogen.

2.4.4 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration als Maß für den Mitochondrien-gehalt der Mitochondriensuspension wurde nach der Biuret-methode, modifiziert nach Weichselbaum (13), bestimmt (siehe nachfolgendes Schema). Zur Messung des Leerwertes diente das Biuret-Reagens.

$$\text{Berechnung: } [\text{Protein}] = \Delta E \cdot \frac{\text{mg}}{0,277 \text{ ml}} \cdot \frac{1}{1 \text{ cm}} \cdot \frac{0,50 \text{ ml}}{0,55 \text{ ml}} \quad \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)$$

Schema der Proteinbestimmung:

2.4.5 Funktionsparameter

Die Sauerstoffverbrauchsraten im "state 4" (vor der ADP-Zugabe) und im "state 3" lassen sich aus den Sauerstoffmeßkurven errechnen: Die Steigung der Kurve entspricht der Änderung der Sauerstoffkonzentration pro Zeiteinheit. Durch Multiplikation mit dem Ansatzvolumen erhält man den Sauerstoffverbrauch pro Zeiteinheit, der noch durch die eingesetzte Proteinmenge dividiert wird.

Einheit: $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$

Der Quotient aus den Sauerstoffverbrauchsrate in "state 3" und "state 4" wird Atmungskontrollquotient (=RCR = respiratoric control ratio) genannt (14) und dient als Maß für die Kopplung der ATP-Synthese mit der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien.

Als Ausdruck der Funktionsfähigkeit der Mitochondrien wurde die ATP-Bildungsrate ermittelt, indem die synthetisierte ATP-Menge durch die Dauer der Phosphorylierungsphase ("state 3") und durch die eingesetzte Proteinmenge dividiert wurde. (Einheit: $\text{nmol ATP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)

Falls der Übergang von einem Zustand ("state") zum anderen bei stärker geschädigten Mitochondrien nicht abrupt erfolgte, wurden Tangenten an die Kurven gelegt und die Tangentenschnittpunkte als Anfangs- bzw. Endpunkte der Phosphorylierungsphase betrachtet.

Zur Berechnung des in der Literatur üblichen P/O Quotienten (14) wurde angenommen, daß die Sauerstoffverbrauchsrate im "state 4" auch im aktivierten Zustand ("state 3") nicht für die ATP-Synthese zur Verfügung steht.

$$\text{P/O} = \frac{\text{gebildete ATP-Menge}}{2 \cdot (\text{state3} - \text{state4}) \cdot (\text{Dauer des state3}) \cdot (\text{Proteinmenge})}$$

Die "2" im Nenner ergibt sich daraus, daß der P/O Quotient sich definitionsgemäß auf Atome (statt Moleküle) Sauerstoff bezieht. Mit "state3" bzw. "state4" sind die Sauerstoffverbrauchsdaten in den betreffenden Zuständen gemeint. Der P/O Quotient ist ein Maß für den Wirkungsgrad der oxidativen Phosphorylierung.

2.5 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Mitochondrienstruktur

Die Hirnmitochondrien von einem Versuchstier wurden nach null Minuten Ischämie, und die von zwei anderen Tieren nach 20 Minuten Ischämie gemäß der unter 2.4.1 angegebenen Methode präpariert. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Mitochondrienniederschlag in 3% Glutaraldehydlösung fixiert, gewaschen, in 2% Osmiumtetroxid nachfixiert, in Alkohol entwässert und mit Epon eingebettet. Die Präparate wurden auf einem LKB Ultramikrotom geschnitten, mit Uranylacetat in 50% Alkohol und Bleiacetat gefärbt, und mit einem Elektronenmikroskop der Firma Siemens untersucht.

Die Aufarbeitung des Mitochondrienniederschlags sowie die morphologische Untersuchung und Beurteilung hat Frau Professor Dr. Drecoll-Lütjen vom Institut für Anatomie der Universität Erlangen-Nürnberg durchgeführt.

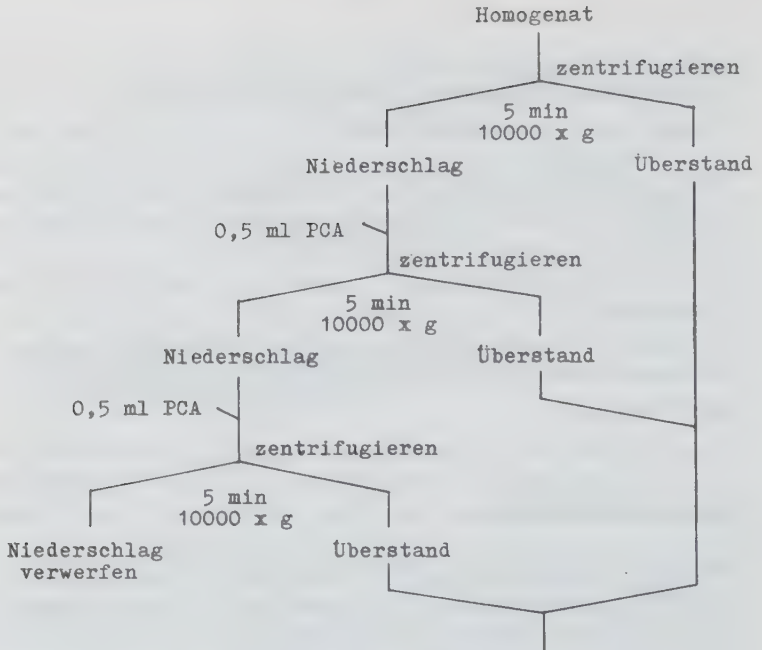
2.6 Untersuchung des Adeninnukleotidgehalts im Rattenhirn

Zur Charakterisierung der energetischen Situation im Hirngewebe nach Ischämie wurde der Gehalt an ATP, ADP und AMP pro Gramm Frischgewicht gemessen.

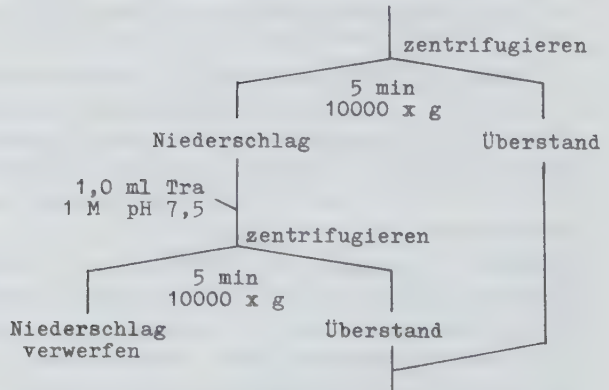
Für die Ischämiezeiten 0 min und 10 min wurden je 6 Tiere untersucht, für die Ischämiezeiten 5 min und 20 min je 4 Tiere. Die enzymatisch-optischen Bestimmungen wurden mindestens zweimal durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt.

2.6.1 Präparation

Narkose, Ischämie und Hirnpräparation erfolgten wie unter 2.3 beschrieben. Das freigelegte Hirn wurde nun mit einem eisgekühlten Löffel herausgehoben und mit den Aluminiumbacken einer Frierstoppzange nach Wollenberger (15) gepreßt, die in flüssigem Stickstoff vorgekühlt waren. Dabei wurde besonders darauf geachtet, daß die Zeit zwischen dem Öffnen der Schädeldecken und der Abkühlung des Gewebes mit der Frierstoppzange möglichst kurz war (20 bis 25 Sekunden; daher "0,4 min" statt "0 min" als Ischämiezeit). Aus diesem Grund mußte auch darauf verzichtet werden, das Organ vollständig zu gewinnen. Nur das Gewebe, das sich zwischen den Backen der Frierstoppzange befand, wurde nun, ständig von flüssigem Stickstoff umgeben, fein gemörsert. Auf einer Waage (Mettler PL 1200) war vorher ein Homogenisierglas mit 4 ml eiskalter PCA (pH 1,0) vorbereitet worden. Das gefrorene, gemörserte Gewebe wurde in dem Augenblick, da der flüssige Stickstoff im Mörser gerade verdampft war, in das Homogenisierglas geschüttet und nach dem



Neutralisation mit KOH
Ausfällung von Kaliumperchlorat



auffüllen auf 9 ml
mit H₂O bidest.

neutralisierter
PCA-Überstand

Ablesen der Waage sofort in der PCA homogenisiert. Das Homogenat mußte nun in ein Zentrifugenröhrchen umgefüllt werden; dazu wurde das Homogenisierglas samt Pistill zweimal mit je 1 ml der PCA nachgespült. Die weitere Aufarbeitung gibt das vorseitige Schema wieder.

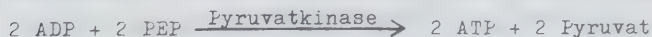
Bei den Ischämiezeiten 5 min, 10 min und 20 min wurde auf den Frierstopp mit flüssigem Stickstoff verzichtet und das Hirn sofort in das Homogenisierglas mit der PCA gegeben. Die Vergleichbarkeit der beiden Methoden konnte in Vorversuchen gezeigt werden.

2.6.2 Enzymatische Bestimmung

Die Messung der ATP-Konzentration folgte der Beschreibung auf Seite 15. Nach Ischämie war der ATP-Gehalt oft so gering, daß 4 cm Küvetten verwendet wurden.

Die Messung der ADP- und AMP-Konzentrationen erfolgte nach Möglichkeit im gleichen Ansatz bei der Wellenlänge 340 nm in einer 2 cm Halbmikroküvette nach folgendem Schema:

Reaktionsweg:



Pipettierplan:

Neutralisierter PCA-Überstand	1,000 ml
Tra 1 M pH 7,5	0,050 ml
NADH ₂ 10 mM	0,010 ml
MgSO ₄ (125mM), KCl (250mM), PEP (25mM)	0,040 ml
LDH	0,010 ml
Pyruvatkinase	0,010 ml
Myokinase (nur für AMP-Messung)	0,020 ml

Berechnung:

$$\text{ADP} = \Delta E \cdot \frac{10^6 \text{ nmol cm}}{6,3 \text{ l}} \cdot \frac{1}{2 \text{ cm}} \cdot \frac{1,12 \text{ ml}}{1,00 \text{ ml}} \cdot \frac{9 \text{ ml}}{\text{Probengewicht}}$$

$$\text{AMP} = \frac{1}{2} \cdot \Delta E \cdot \frac{10^6 \text{ nmol cm}}{6,3 \text{ l}} \cdot \frac{1}{2 \text{ cm}} \cdot \frac{1,14 \text{ ml}}{1,00 \text{ ml}} \cdot \frac{9 \text{ ml}}{\text{Probengewicht}}$$

$$\text{Einheit: } \frac{\text{nmol}}{\text{g Frischgewicht}}$$

Die Eigenextinktion des Startenzym Pyruvatkinase bzw. Myokinase wurde jedesmal bestimmt und entsprechend berücksichtigt. Der Faktor " $\frac{1}{2}$ " bei der Berechnung von AMP rührt daher, daß pro AMP zwei ADP und damit zwei NAD Moleküle entstehen. Falls die zu messenden Mengen für diesen Meßansatz zu groß waren, wurden die Proben vor der Messung entsprechend verdünnt.

2.6.3 Berechnung des "Energy charge"

Neben den bloßen Adeninnukleotidkonzentrationen dient der "Energy charge" zur Charakterisierung des Energieniveaus der Zellen (14). Er ist definiert als

$$\text{E.C.} = \frac{\text{ATP} + 0,5 \cdot \text{ADP}}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}}$$

Dieser Wert gibt den Anteil des energiereichen ATP an der Summe der Adeninnukleotide an. Dabei wird berücksichtigt, daß nach der Gleichung



zwei ADP-Moleküle einem ATP-Molekül energetisch entsprechen.

2.7 Statistische Methoden

Die gemessenen ATP-Bildungsraten und die berechneten Summen der Adeninnukleotide lassen vermuten, daß die Werte einer Exponentialfunktion folgen. Aus diesem Grund wurden in diesen Fällen die Zahlenwerte logarithmiert und damit die Regressionsgerade und das Bestimmtheitsmaß berechnet. Letzteres ist das Quadrat des Korrelationskoeffizienten. Es gibt an, welcher Anteil der Varianz aller (24 bzw. 20) Meßwerte durch die Annahme eines exponentiellen Abfalls erklärt werden kann. Ob die Steigung der Regressionsgeraden (Regressionskoeffizient) signifikant von null verschieden ist, das heißt, ob sich die Werte signifikant mit der Ischämiedauer ändern, läßt sich formal durch Prüfung des Korrelationskoeffizienten auf null testen (16).

Bei allen übrigen Ergebnissen (Sauerstoffverbrauchsrate, Atmungskontrollquotienten, ATP-, ADP- und AMP-Konzentrationen und "Energy charge") wurden Varianzanalysen nach Scheffé (16) durchgeführt. Dabei wurde überprüft, ob sich die Werte der betreffenden Messung für jeweils zwei aufeinander folgende Ischämiezeiten statistisch signifikant unterscheiden.

3. E R G E B N I S S E

3.1 Mitochondrienfunktion: Sauerstoffverbrauchsrate, ATP-Bildungsrate und Atmungskontrollquotienten in Abhängigkeit von der Ischämiedauer

Die ermittelten Sauerstoffverbrauchsrate, ATP-Bildungsrate und Atmungskontrollquotienten sind für das Substrat Malat in Tabelle 1 und für das Substrat Succinat in Tabelle 2 zusammengefaßt. Der P/O Quotient wird jeweils nur für die Kontrollwerte (ohne Ischämie) angegeben (vgl. hierzu Kapitel 4.3). Das Verhalten der Atmungskontrollquotienten und der ATP-Bildungsrate während der Ischämie wird in den Abbildungen 2 und 3 zusätzlich graphisch veranschaulicht.

3.1.1 Sauerstoffverbrauchsrate

Wie aus den oben genannten Tabellen hervorgeht, nimmt die Sauerstoffverbrauchsrate bei Verwendung von Malat als Substrat im aktivierten Zustand ("state 3") während der untersuchten Ischämiedauer von 20 min ab und zwar in den ersten fünf Minuten signifikant ($p < 0,01$) und in den nächsten fünf Minuten auffällig ($p < 0,05$).

Im kontrollierten Zustand ("state 4") fällt eine Zunahme der Sauerstoffverbrauchsrate in den ersten fünf Minuten der Ischämie auf ($p < 0,05$), während anschließend ein geringer Abfall zu verzeichnen ist.

Bei Verwendung von Succinat als Substrat ergibt sich hinsichtlich der Sauerstoffverbrauchsrate ein prinzipiell ähnliches Bild: Im aktivierten Zustand zeigt sich eine Abnahme, die allerdings im zweiten Ischämieintervall von fünf bis zehn Minuten am deutlichsten und nur dort

signifikant ($p < 0,01$) ist. Auch im kontrollierten Zustand ergibt sich für diesen Zeitraum eine auffällige Abnahme ($p < 0,05$), während sonst die Veränderungen statistisch unauffällig sind.

Der Atmungskontrollquotient verkleinert sich mit Malat als Substrat (Abb.2; Tab.1) während des ersten und zweiten Ischämieintervalls jeweils hoch signifikant ($p < 0,001$) und in den folgenden zehn Minuten auffallend ($p < 0,05$). Mit Succinat als Substrat (Abb.2; Tab.2) hingegen verkleinert sich der Atmungskontrollquotient während des ersten und zweiten Ischämieintervalls nur (statistisch) unauffällig, um anschließend hoch signifikant ($p < 0,001$) abzufallen.

3.1.2 ATP-Bildungsraten

Die ATP-Bildungsraten nehmen mit der Ischämiedauer sowohl mit Malat als auch mit Succinat als Substrat nicht-linear ab (Abb.3). Die Meßergebnisse lassen an einen exponentiellen Abfall denken. Die Abbildungen 4 und 5 zeigen die Werte in halblogarithmischer Auftragung zusammen mit den errechneten Regressionsgeraden. Durch die Annahme, daß die ATP-Bildungsraten Exponentialfunktionen folgen, lassen sich für Malat 82,4 % und für Succinat 83,3 % der aufgetretenen Varianz erklären (Bestimmtheitsmaß r^2). Aus den Steigungen der Regressionsgeraden (Regressionskoeffizienten) errechnen sich für die ATP-Bildungsraten Halbwertszeiten von 14,2 min für Malat und 13,3 min für Succinat als Substrat. Beide Regressionskoeffizienten sind hoch signifikant ($p < 0,001$) von null verschieden, das heißt, die ATP-Bildungsraten fallen hoch signifikant ($p < 0,001$) mit der Ischämiedauer ab.

3.1.3 Vergleich von Sauerstoffverbrauchsrate und ATP-Bildungsrate

Für die Synthese von ATP steigt der Sauerstoffverbrauch am Übergang vom kontrollierten zum aktivierten Zustand deutlich an. Vergleicht man den zusätzlichen Sauerstoffverbrauch während der ATP-Synthese (Differenz der Sauerstoffverbrauchsrate im aktivierten und kontrollierten Zustand) mit den zugehörigen ATP-Bildungsrate, so zeigt sich, daß beide Rate mit zunehmender Ischämiedauer annähernd gleichlaufend abnehmen. Es fällt jedoch auf, daß bei der Verwendung von Malat als Substrat die Sauerstoffnettoverbrauchsrate stärker abfallen als die ATP-Bildungsrate, während bei der Verwendung von Succinat als Substrat die Sauerstoffnettoverbrauchsrate weniger stark abfallen als die ATP-Bildungsrate. Nach 5 min Ischämie tritt dies am deutlichsten zutage. Zur Veranschaulichung dienen die Abbildungen 6 und 7, die die ATP-Bildungsrate und die zugehörigen Sauerstoffnettoverbrauchsrate in Abhängigkeit von der Ischämiedauer zeigen.

Ischämiedauer (min)	Sauerstoffverbrauchsraten		P/O	RCR	ATP-Bildung
	"state 4"	"state 3"			
0	16,8 ± 1,8	54,3 ± 6,4	2,81 ± 0,11	3,24 ± 0,15	211,0 ± 30,8
5	21,5 ± 2,1	42,2 ± 3,8	---	1,96 ± 0,06	130,6 ± 16,2
10	21,3 ± 3,6	32,8 ± 3,7	---	1,56 ± 0,13	105,2 ± 14,7
20	18,8 ± 2,0	24,7 ± 4,1	---	1,31 ± 0,12	75,6 ± 13,7

Tabelle 1:

ATMUNGSFUNKTION VON MITOCHONDRIEN AUS RATTEHIRNEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ISCHÄMIEDAUER
BEI VERWENDUNG VON MALAT ALS SUBSTRAT

Die Tabelle gibt Mittelwerte ± Standardabweichungen wieder, die aus jeweils 6 einzelnen Versuchsergebnissen (tabellarisch im Appendix aufgeführt) berechnet wurden. Die Sauerstoffverbrauchsraten und die ATP-Bildungsraten werden in nmol pro Minute und mg Mitochondrienprotein angegeben. Die Konzentrationen von Malat und Glutamat im Inkubationsansatz waren jeweils 5 mmol/l; die Überführung von "state 4" nach "state 3" erfolgte durch Zugabe von 350 nmol ADP. Eine genauere Beschreibung der Versuchsbedingungen sowie der verwendeten Parameter findet sich in Kapitel 2.4.

Ischämiedauer (min)	Sauerstoffverbrauchsrate		P/O	RCR	ATP-Bildung
	rate 4"	rate 3"			
0	30,6 ± 4,4	73,8 ± 10,6	1,96 ± 0,10	2,42 ± 0,11	169,0 ± 30,4
5	32,1 ± 2,0	71,6 ± 5,6	---	2,24 ± 0,10	116,9 ± 8,9
10	24,5 ± 3,8	52,4 ± 8,0	---	2,17 ± 0,19	84,5 ± 18,2
20	23,7 ± 3,5	41,1 ± 6,4	---	1,74 ± 0,13	58,7 ± 10,4

Tabelle 2:

ATMUNGSPUNKTION VON MITOCHONDRIEN AUS BATTERHIERER IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ISCHÄMIEDAUER
BEI VERWENDUNG VON SUCGINAT ALS SUBSTRAT

Die Tabelle gibt Mittelwerte ± Standardabweichungen wieder, die aus jeweils 6 einzelnen Versuchsergebnissen (tabellarisch im Appendix aufgeführt) berechnet wurden. Die Sauerstoffverbrauchsrate und die ATP-Bildungsrate werden in $\mu\text{mol pro Minute und mg Mitochondrienprotein}$ angegeben. Die Konzentration von Succinat im Inkubationsmedium betrug 10 $\mu\text{mol/l}$; Rotations war in einer Konzentration von $\frac{1}{2}$ $\mu\text{mol/l}$ zugegen. Die Überführung von "rate 4" nach "rate 3" erfolgte durch Zugabe von 5% $\mu\text{mol klbf. Eins}$ genaueste Beschreibung der Versuchsbedingungen sowie der verwendeten Parameter findet sich in Kapitel 2.4.

Abbildung 2: Atmungs- und Stoffwechselraten von Kitochoonarien

aus Vattenbirnen in Abhängigkeit von der
Ischämiedauer bei Verwendung der Substrate

Isolat Gew. Substrat

Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen

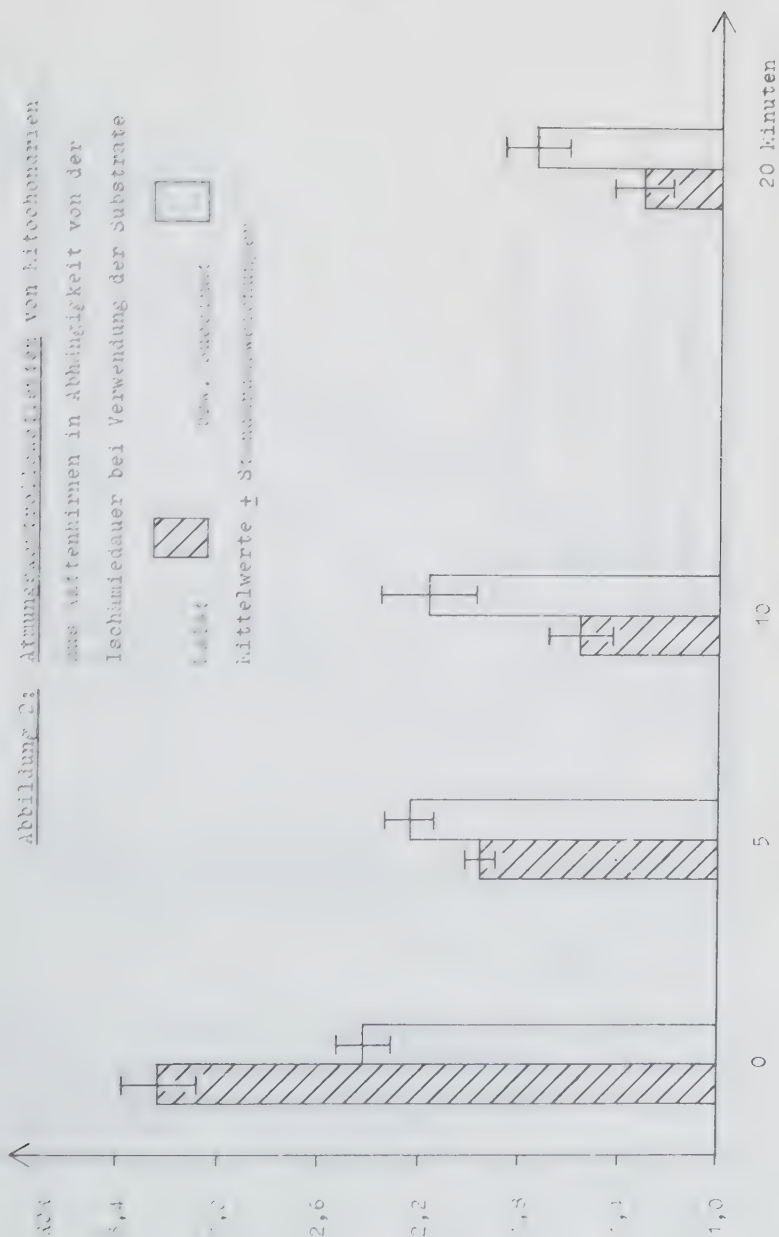
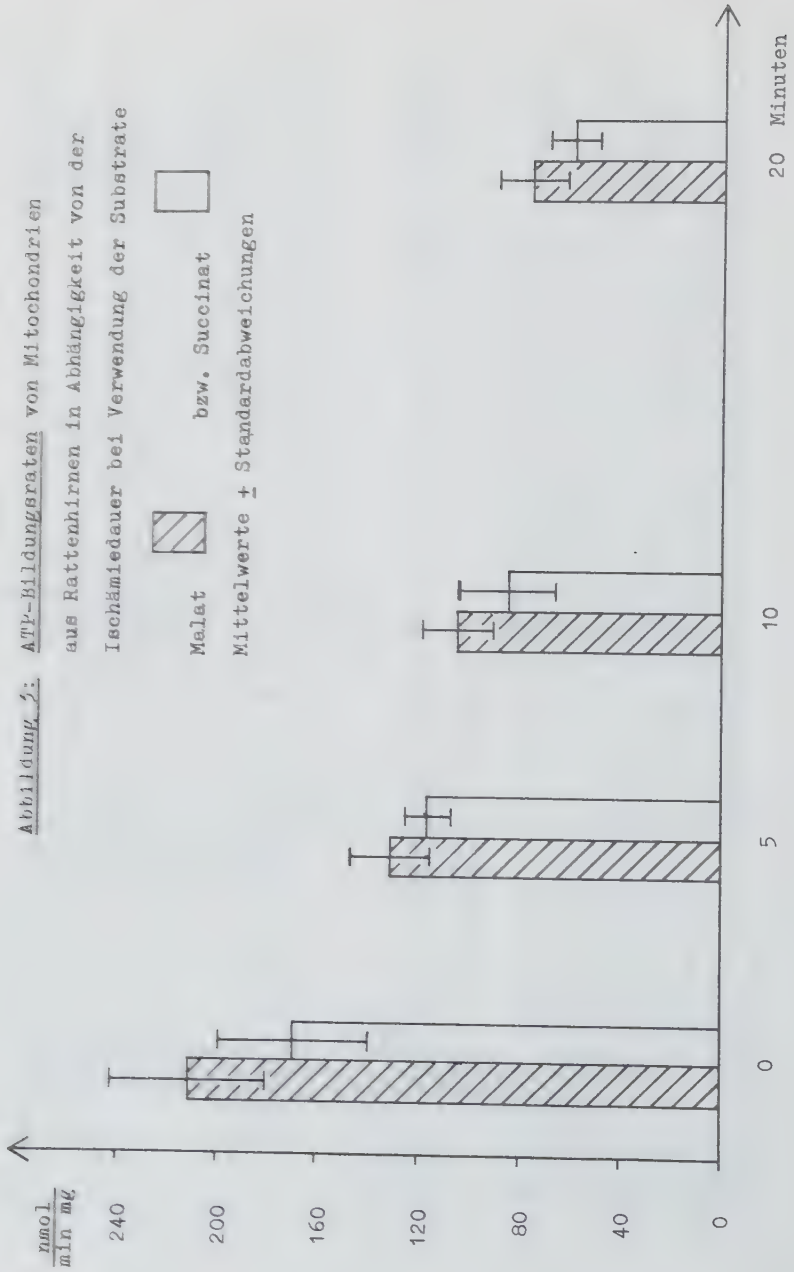


Abbildung 2: ATP-Bildungsraten von Mitochondrien aus Rattenhirnen in Abhängigkeit von der Ischämiedauer bei Verwendung der Substrate Melat bzw. Succinat



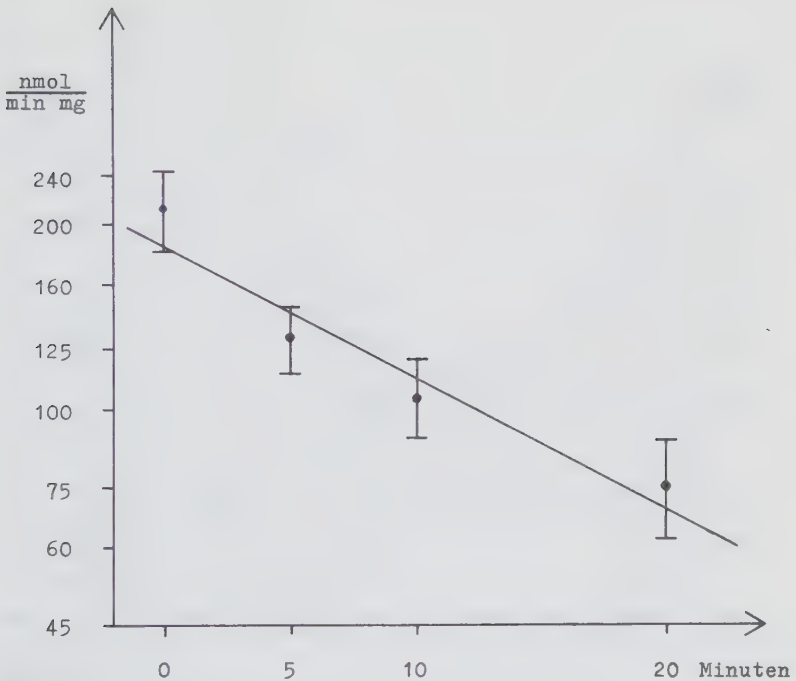


Abbildung 4

HALBLOGARITHMISCHE AUFTRAGUNG DER ATP-BILDUNGSRATEN
 VON MITOCHONDRIEN AUS RATTENHIRNEN IN ABHÄNGIGKEIT
 VON DER ISCHÄMIEDAUER SUBSTRAT: MALAT

Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen und Regressionsgerade

Regressionskoeffizient $b = -0,0487$

Signifikanzniveau $p < 0,001$

Bestimmtheitsmaß $r^2 = 0,824$

Halbwertszeit 14,2 min

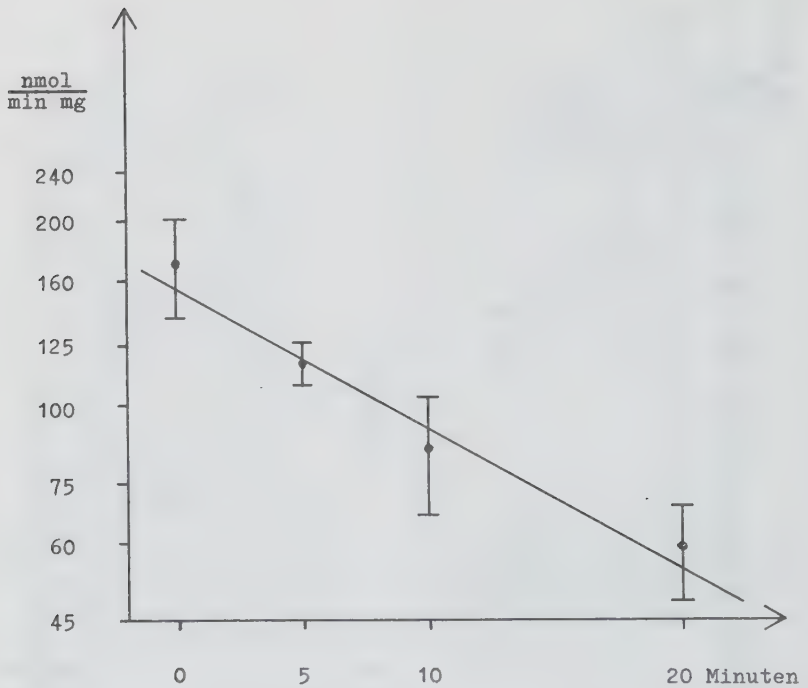


Abbildung 5

HALBLOGARITHMISCHE AUFTRAGUNG DER ATP-BILDUNGSRATEN
 VON MITOCHONDRIEN AUS RATTENHIRNEN IN ABHÄNGIGKEIT
 VON DER ISCHÄMIEDAUER SUBSTRAT: SUCCINAT

Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen und Regressionsgerade
 Regressionskoeffizient $b = -0,0522$
 Signifikanzniveau $p < 0,001$
 Bestimmtheitsmaß $r^2 = 0,833$
 Halbwertszeit 13,3 min

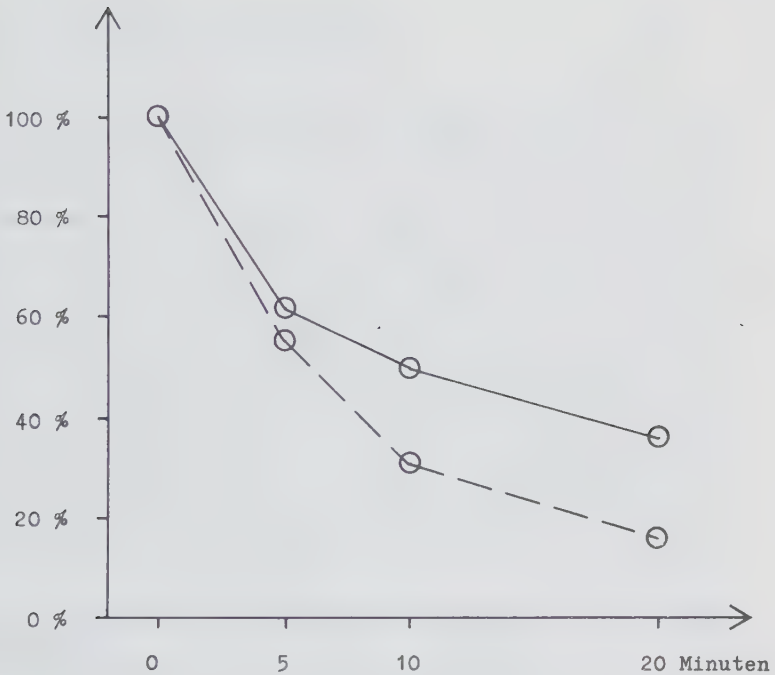


Abbildung 6

ATP-BILDUNGSRATEN UND SAUERSTOFFNETTOVERBRAUCHSRATEN
VON MITOCHONDRIEN AUS RATTENHIRNEN IN ABHÄNGIGKEIT
VON DER ISCHAMIEDAUER SUBSTRAT: MALAT

- ⊙ — ⊙ ATP-Bildungsraten
⊙ — ⊙ Sauerstoffnettoverbrauchsrate (Differenz aus
den Sauerstoffverbrauchsrate im aktivierten
und kontrollierten Zustand)

Alle Werte sind in Prozent des jeweiligen Ausgangswertes
(ohne Ischämie) angegeben.

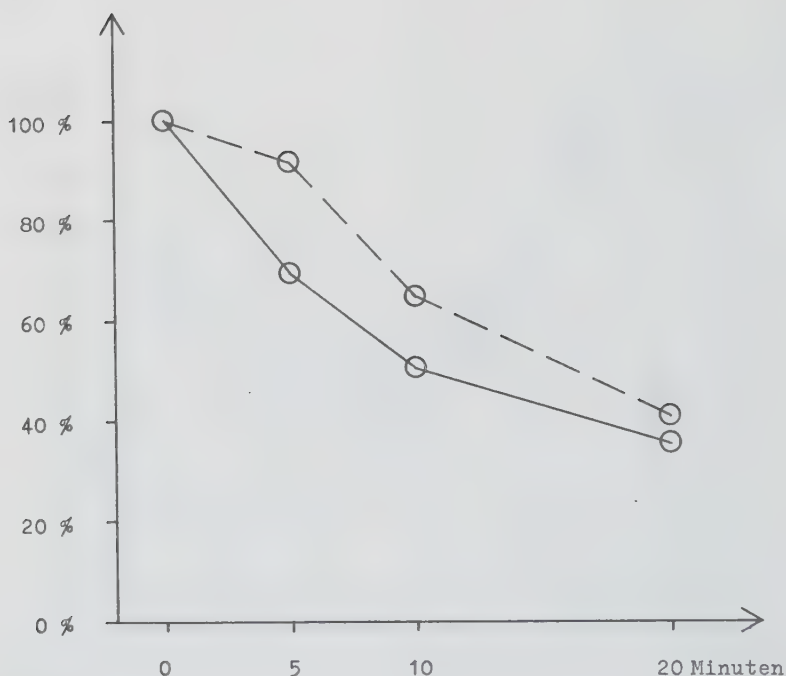


Abbildung 7

ATP-BILDUNGSRATEN UND SAUERSTOFFNETTOVERBRAUCHSRATEN
VON MITOCHONDRIEN AUS RATTENHIRNEN IN ABHÄNGIGKEIT
VON DER ISCHÄMIEDAUER SUBSTRAT: SUCCINAT

- ⊖ — ⊖ ATP-Bildungsraten
⊖ — ⊖ Sauerstoffnettoverbrauchsrate (Differenz aus
den Sauerstoffverbrauchsrate im aktivierten
und kontrollierten Zustand)

Alle Werte sind in Prozent des jeweiligen Ausgangswertes
(ohne Ischämie) angegeben.

3.2 Mitochondrienmorphologie nach 0 min und 20 min Ischämie

Von 300 untersuchten Mitochondrien zeigten in der Kontrolle (ohne Ischämie, Versuchstier Nr. 1) 94 % eine helle Matrix und dicke Cristae (Normalbefund), 6 % waren zerstört (geplatzt).

Nach 20 min Ischämie waren beim Versuchstier Nr. 2 von 300 untersuchten Mitochondrien noch 83 % intakt und 17 % zerstört. Beim Versuchstier Nr. 3 betrug bei 150 untersuchten Mitochondrien der Anteil der intakten 82,2 %, während 17,8 % der Mitochondrien zerstört waren.

Die Abbildungen 8 und 9 zeigen jeweils einen repräsentativen Ausschnitt eines elektronenmikroskopischen Bildes von Mitochondrien, die nach 0 min bzw. nach 20 min Ischämie aus Rattenhirnen präpariert worden waren. Die Zeichenerklärung hierzu findet sich in der Tabelle 3, die die Ergebnisse noch einmal zusammenfaßt.

Tabelle 3:

Morphologische Beurteilung von Mitochondrien aus Rattenhirnen nach 0 min und 20 min Ischämie

Versuchstier Nr.	Ischämie dauer	untersuchte Mitochondrien	intakt	zerstört
1	0 min	300	94 %	6 %
2	20 min	300	83 %	17 %
3	20 min	150	82,2 %	17,8 %
Markierung in den Abb. 8 und 9			→	*

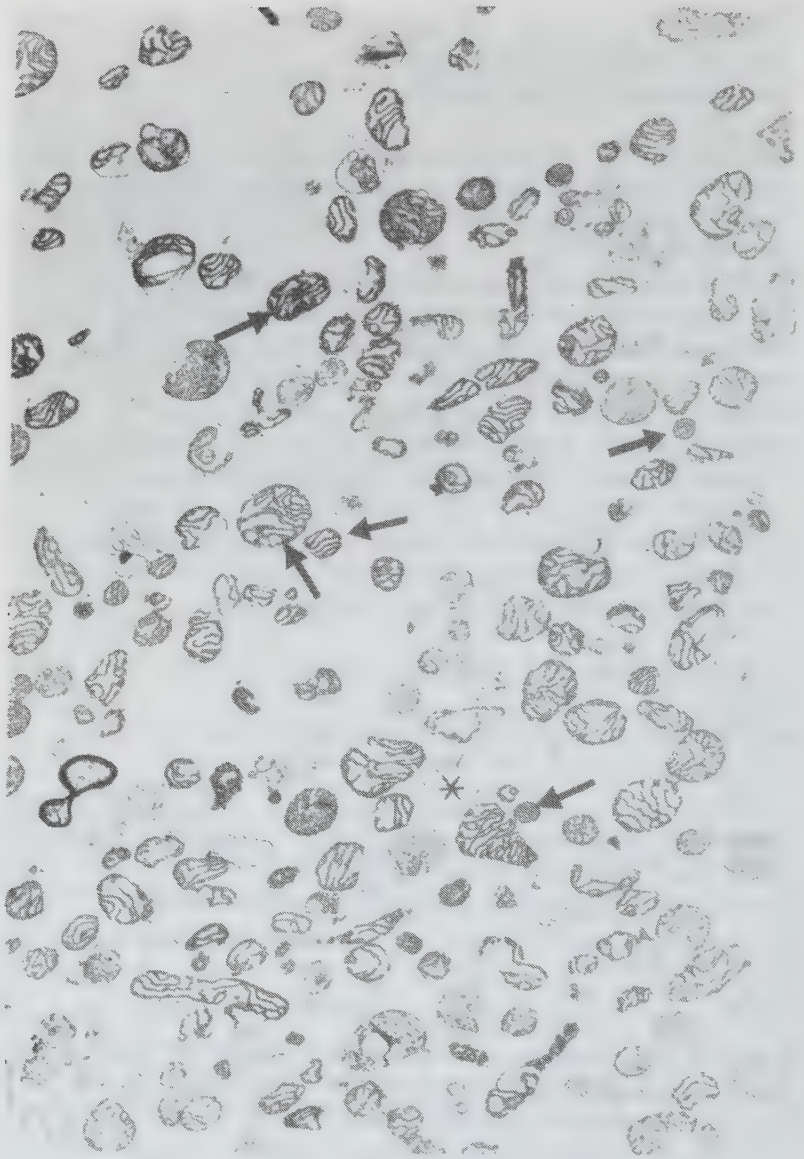


Abbildung 8

Mitochondrien aus Rattenhirnen nach 0 min Ischämie

Vergrößerung 18000 fach; Zeichenerklärung siehe Tab.3

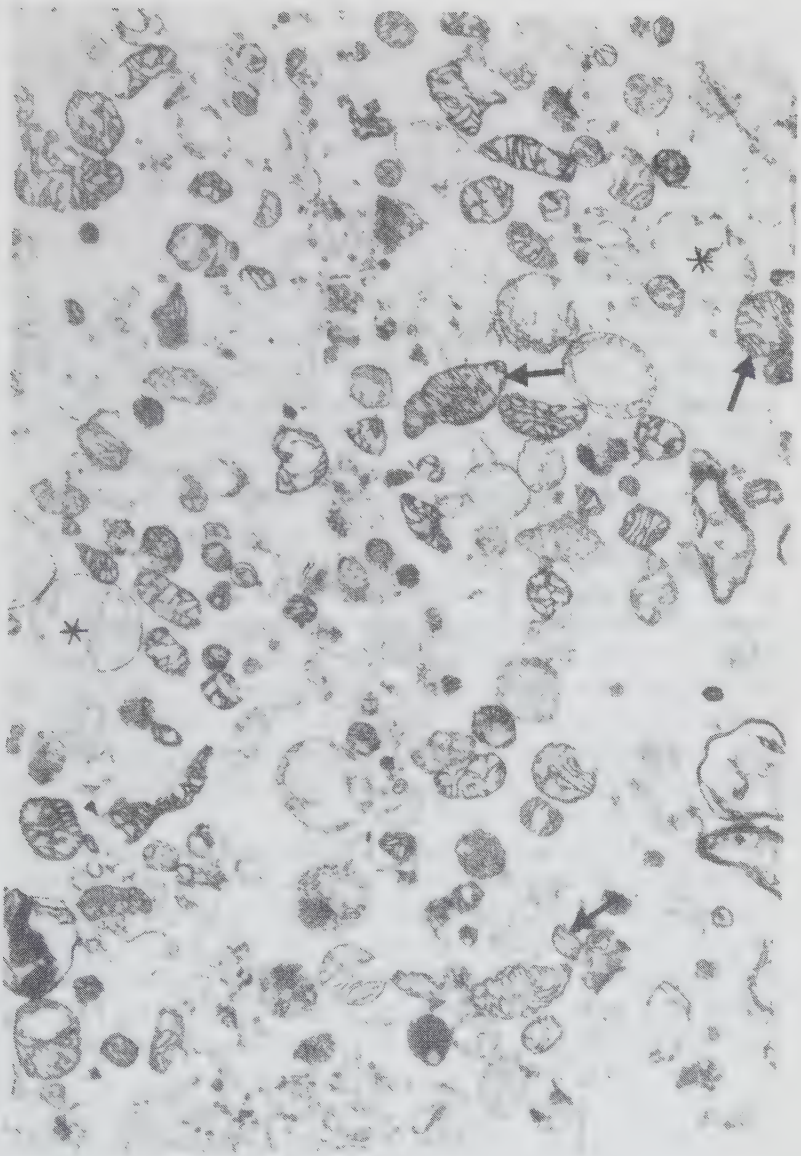


Abbildung 9

Mitochondrien aus Rattenhirnen nach 20 min Ischämie

Vergrößerung 18000 fach; Zeichenerklärung siehe Tab.3

3.3 Adeninnukleotidkonzentrationen im Rattenhirn in Abhängigkeit von der Ischämiedauer

Tabelle 4 zeigt die ermittelten Konzentrationen der Adeninnukleotide ATP, ADP und AMP, ihre jeweilige Summe und den daraus berechneten "Energy charge" für die verschiedenen Ischämiezeiten. Zur graphischen Veranschaulichung dienen die Abbildungen 10 und 11.

Während einer Ischämiedauer von fünf Minuten treten bei allen aufgeführten Parametern hoch signifikante Veränderungen ($p < 0,001$) auf: Der ATP-Gehalt sinkt auf ein Fünfzigstel des Ausgangswertes; auch der ADP-Gehalt sinkt deutlich ab, während sich gleichzeitig der AMP-Gehalt mehr als vervierfacht. Aus den eindrucksvollen Konzentrationsverschiebungen der Adeninnukleotide resultiert ein Abfall des "Energy charge" auf ein Siebtel des Ausgangswertes.

In den folgenden Ischämieintervallen ändert sich nicht mehr viel am Verhältnis der Adeninnukleotidkonzentrationen zueinander, was auch in den relativ konstanten Werten des "Energy charge" zum Ausdruck kommt. Die Konzentrationen von ATP, ADP und AMP fallen im Zeitraum von fünf bis zwanzig Minuten Ischämie prozentual etwa gleichmäßig ab. Lediglich der Abfall von AMP ist noch hoch signifikant ($p < 0,001$).

Die Summe der drei gemessenen Adeninnukleotidkonzentrationen (Abb. 11) fällt während der gesamten Ischämiedauer von zwanzig Minuten nahezu exponentiell ab. Die Abbildung 12 veranschaulicht dies durch eine halblogarithmische Darstellung. Die Annahme des exponentiellen Abfalls vermag 89,8 % der aufgetretenen Varianz zu erklären (Bestimmtheitsmaß r^2). Aus der Steigung der Regressions-

geraden folgt rechnerisch eine Halbwertszeit von 20,3 min. Der Regressionskoeffizient ist hoch signifikant ($p < 0,001$) von null verschieden, das heißt, die Summe der Adeninnukleotidkonzentrationen nimmt hoch signifikant ($p < 0,001$) mit der Ischämiedauer ab.

Ischämie	n	ATP	ADP	AMP	ATP+ADP+AMP	"Energy charge"
0,4 min	6	1339 ± 99	885 ± 108	371 ± 38	2596 ± 108	0,687 ± 0,025
5 min	4	26 ± 7	321 ± 27	1571 ± 68	1918 ± 44	0,098 ± 0,012
10 min	6	21 ± 6	270 ± 27	1336 ± 82	1627 ± 95	0,096 ± 0,010
20 min	4	9 ± 5	220 ± 19	1093 ± 58	1321 ± 56	0,090 ± 0,009

Tabelle 4:

ADENINNUKLEOTIDKONZENTRATIONEN UND "ENERGY CHARGE" IN RATTEHIRNEN
IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ISCHÄMIEDAUER

Die Tabelle gibt Mittelwerte ± Standardabweichungen wieder, die aus jeweils 4 bis 6 einzelnen Versuchsergebnissen (tabellarisch im Appendix aufgeführt) berechnet wurden. Die Nukleotidkonzentrationen sind in mmol pro Gramm Frischgewicht angegeben.

Abbildung 10: Adeninukleotidkonzentrationen

im Rattenhirn

in Abhängigkeit von der Ischämiedauer



Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen

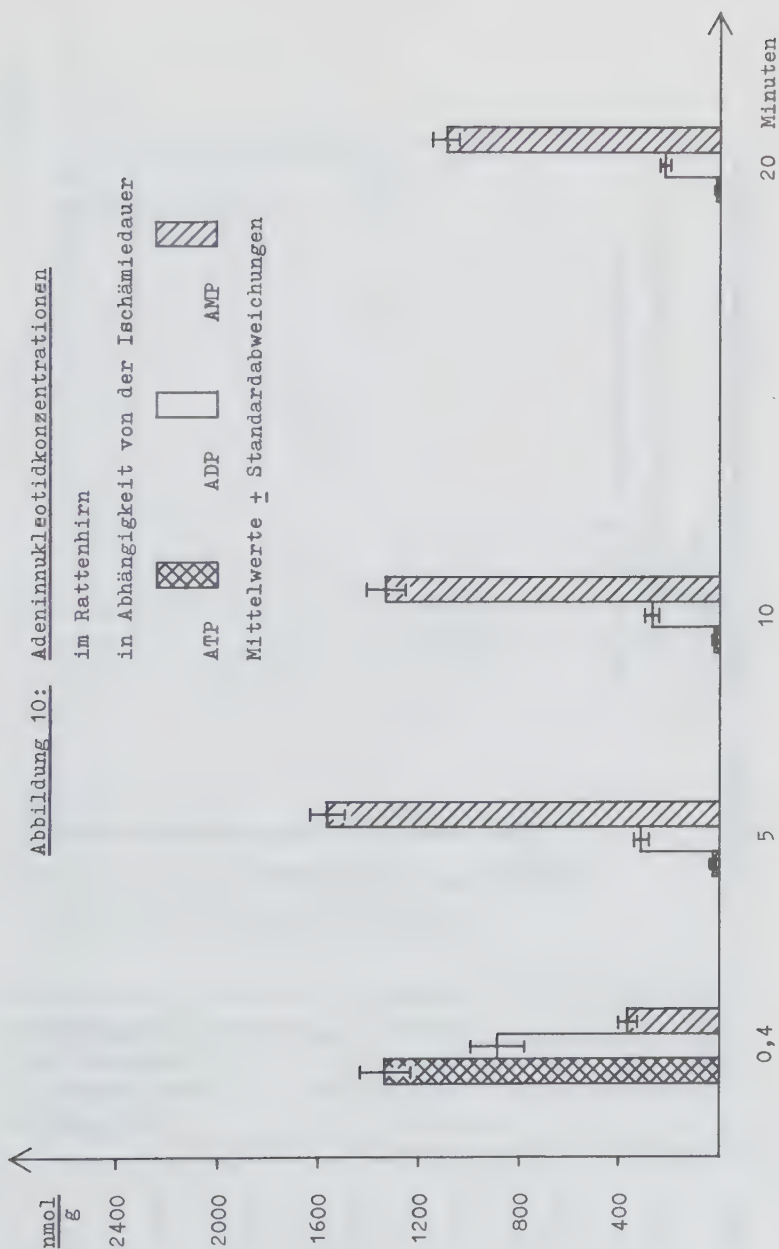
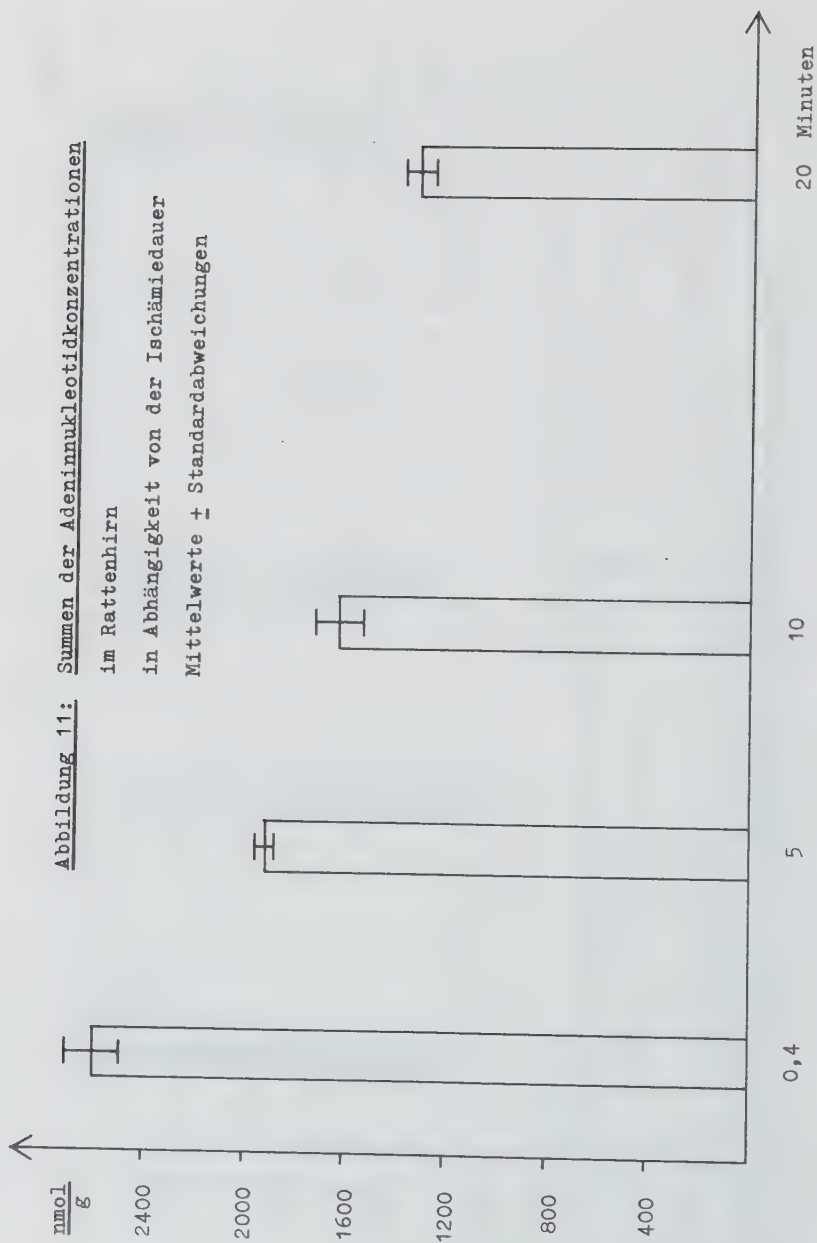


Abbildung 11: Summen der Adeninnukleotidkonzentrationen
im Rattenhirn
in Abhängigkeit von der Ischämiedauer
Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen



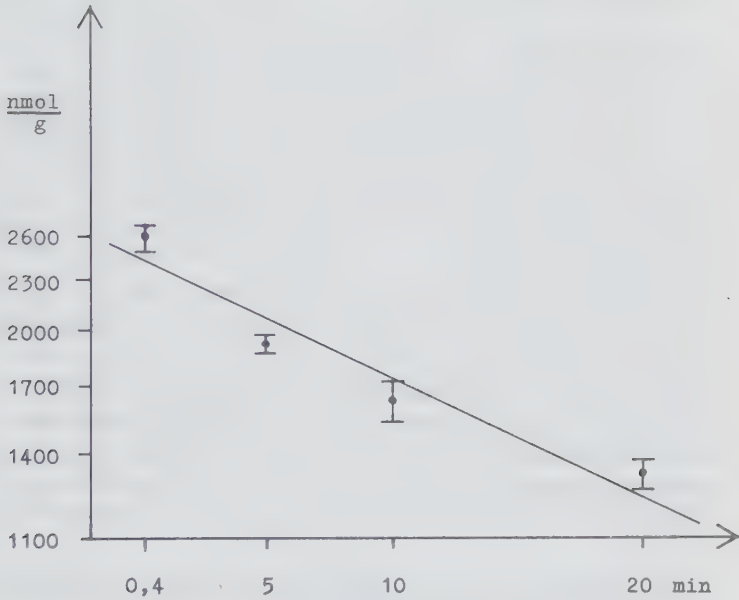


Abbildung 12

HALBLOGARITHMISCHE DARSTELLUNG DER SUMMEN DER
ADENINNUKLEOTIDKONZENTRATIONEN IM RATTENHIRN
IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ISCHÄMIEDAUER

Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen und Regressionsgerade	
Regressionskoeffizient	$b = -0,0342$
Signifikanzniveau	$p < 0,001$
Bestimmtheitsmaß	$r^2 = 0,898$
Halbwertszeit	20,3 min

4. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, die Empfindlichkeit von Hirn-mitochondrien gegenüber vollständiger Ischämie in situ bei 37°C zu untersuchen. Zum Nachweis einer Schädigung dienten Sauerstoffverbrauchsdaten und ATP-Bildungsraten sowie morphologische Kriterien als Parameter. Zusätzlich wurden unter den gleichen Bedingungen die Adeninnukleotidkonzentrationen (ATP, ADP und AMP) und der "Energy charge" im Gehirn bestimmt.

Die Ergebnisse zeigen übereinstimmend für beide Substrate einen deutlichen, und mit der Ischämiedauer zunehmenden Abfall sowohl der ATP-Bildungsraten als auch der ADP-induzierten Sauerstoffverbrauchsdaten. Die ischämiebedingte Unterbrechung der Sauerstoff- und Substratzufuhr führte zu einem sehr raschen Abfall der energiereichen Adeninnukleotide im Gehirn.

4.1 Diskussion der Versuche zur Auswirkung der Ischämie auf den Adeninnukleotidgehalt

Die Adeninnukleotidkonzentrationen wurden exakt unter den Bedingungen bestimmt, unter denen das Gehirn zur Isolierung von Mitochondrien für die funktionellen Untersuchungen entnommen worden war. Dadurch wurde es möglich, den jeweiligen Funktionszustand der Mitochondrien mit dem zu dieser Zeit vorliegenden energetischen Zustand ("Energy charge") sowie mit dem Vorrat an Adeninnukleotiden zu vergleichen.

Erwartungsgemäß waren im Gehirn nach 5 min Ischämie die unmittelbaren Energiereserven in Form von ATP und ADP praktisch aufgebraucht (Abb. 10), was auch in dem massiven Abfall des "Energy charge" auf etwa 14 % des Ausgangswertes

zum Ausdruck kommt. Infolge der Dephosphorylierung von ATP und ADP nahm die AMP-Konzentration in dieser Zeit erheblich zu. Die relativ großen Standardabweichungen bei den Kontrollwerten (0,4 min Ischämie) deuten darauf hin, daß der Abbau von ATP möglicherweise schon größtenteils in der ersten Ischämie minute erfolgte, was durch Ergebnisse anderer Autoren (siehe unten) bestätigt wird. Während der energetische Zustand ("Energy charge") nach 5 min Ischämie bereits ein Minimum erreicht hatte, nahm die Summe der Adeninnukleotide innerhalb von 20 min Ischämie kontinuierlich ab, was mit einem Abbau von AMP erklärt werden kann (17).

In der Literatur finden sich zahlreiche Arbeiten zur Bestimmung von Adeninnukleotidkonzentrationen im Gehirn unter vielfältigen Versuchsbedingungen und Fragestellungen. Zur Auswirkung von Ischämie auf den Adeninnukleotidgehalt bei erwachsenen Tieren sind folgende Autoren zu zitieren:

Goldberg et al. (7) dekapitierten Mäuse und bestimmten die ATP- und ADP-Konzentrationen nach 5 sec, 10 sec und 30 sec. Dabei zeigte sich ein Abfall der ATP-Konzentration von 2950 nmol/g (Kontrollwert) auf 1670 nmol/g nach 30 sec Ischämie.

Levy und Duffy (18) dekapitierten mongolische Gerbille (*Meriones unguiculatus*) nach vorheriger Entfernung der Kopfhaut zwecks schnellerer Kühlung. Die Konzentrationen von ATP, ADP, AMP und Kreatinphosphat wurden nach 5 sec, 10 sec und 15 sec Ischämie gemessen. Der ATP-Spiegel sank innerhalb von 15 sec Ischämie von 2540 nmol/g auf 2340 nmol/g.

Deuticke et al. (17) froren narkotisierte Ratten im ganzen ein. Neben dem Gehirn wurden - bei etwas veränderter Technik - auch die Organe Herz, Skelettmuskel, Leber und Niere nach Ischämiezeiten von 5 min bis 60 min untersucht. Dabei wurden bis zu 12 Purin- und 5 Uracilverbindungen bestimmt. Im Gehirn fiel beispielsweise der ATP-Gehalt von 1870 nmol/g (Kontrollwert) auf 20 nmol/g innerhalb von 10 min Ischämie, während gleichzeitig die Summe von sieben Purinnukleotiden von 3030 nmol/g auf 2220 nmol/g abnahm. Durch die Analyse so vieler Purinverbindungen läßt sich der Abbau quantitativ verfolgen und zwischen den Organen vergleichen. Viele interessante Details konnten damit aufgedeckt werden, wie etwa der Befund, daß Ribonukleinsäuren unter den Bedingungen der Ischämie höchstwahrscheinlich nicht zu Mononukleotiden oder darüber hinaus abgebaut werden, weil die Summe der Purinnukleotide und ihrer erfaßten Abbauprodukte annähernd konstant blieb. Besonders zu erwähnen ist noch der Hinweis, daß der Nukleotidabbau wegen der Membrandurchlässigkeit für freie Nukleoside und Purine zu einem essentiellen Verlust an Nukleotidbausteinen führen muß, der seinerseits die post-anoxische Regeneration deutlich beeinträchtigen dürfte.

Ljunggren et al. (19) erzeugten die Ischämie in Ratten durch künstlich erhöhten intracraniellen Druck. Über den dazu angelegten Kanal brachten die Autoren anschließend flüssigen Stickstoff direkt ans Hirn; bei allen vorher genannten Arbeiten war das ganze Tier bzw. der abgetrennte Kopf in die Kühlflüssigkeit gegeben worden.

Ljunggren et al. bestimmten neben Adeninnukleotiden und Kreatinphosphat auch einige Kohlehydratmetaboliten und Aminosäuren nach Ischämiezeiten zwischen 1 min und 15 min. Der ATP-Spiegel war nach 10 min Ischämie von 3060 nmol/g (Kontrollwert) auf 90 nmol/g gesunken, womit ein Abfall des "Energy charge" von 0,951 auf 0,13 verbunden war.

Berücksichtigt man die Unterschiede in der Präparationstechnik und in der Tierspezies, so zeigt sich übereinstimmend für alle zitierten Autoren, daß nach wenigen Minuten Ischämie praktisch alle energiereichen Nukleotide verbraucht sind und daß gleichzeitig ein Abbau der Adeninnukleotide einsetzt (Abb.10;11;12).

Die in diesem Zusammenhang gewonnenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen somit gut mit den Literaturangaben überein. Bei den Kontrollwerten ohne Ischämie konnten die in der Literatur berichteten hohen ATP-Spiegel nicht gemessen werden, weil bei der Hirnpräparation aus technischen Gründen eine Ischämie von ca. 0,4 min Dauer unvermeidbar war. Eine Verkürzung dieser Ischämiezeit ist bei Ratten nur durch Injektion von flüssigem Stickstoff in die Schädelhöhle möglich. Ljunggren et al. (19) konnten mit dieser Technik ATP-Spiegel von etwa 3000 nmol/g messen.

Da bereits nach weniger als 5 min Ischämie alle energiereichen Adeninnukleotide aufgebraucht sind, dürften nach dieser Zeit sämtliche energieabhängigen Reaktionen und Zellfunktionen zum Erliegen kommen. Gleichzeitig, aber deutlich langsamer, erfolgt ein Abbau von AMP. Die Abbauraten lassen in erster Näherung an eine Exponentialfunktion denken; es dürfte sich jedoch genauer genommen um einen komplizierteren Zusammenhang handeln. Der AMP-Abbau hat zur Folge, daß in einer eventuellen Regenerationsphase die ATP-Synthese durch einen Mangel an Ausgangsprodukten (ADP,AMP) limitiert wird. Der Adeninnukleotidverlust müßte in diesem Fall erst durch eine ATP-abhängige Neusynthese ausgeglichen werden. Der zunehmende Adeninnukleotidverlust während der Ischämie dürfte somit seinerseits die Regenerationsfähigkeit zeitlich begrenzen (17).

4.2 Diskussion der Versuche zur Auswirkung der Ischämie auf die Mitochondrienstruktur

Im Kontrollversuch ohne Ischämie waren 94 % der Mitochondrien intakt. Durch den Präparationsvorgang wurden also nur wenige Mitochondrien zerstört. Die Aufnahmen (Abb.8) zeigen außerdem, daß die Mitochondriensuspension kaum durch andere Zellorganellen oder Synaptosomen verunreinigt ist.

Nach 20 min Ischämie waren noch ca. 83 % der Mitochondrien intakt. Im Vergleich mit der erheblichen Einschränkung der Mitochondrienfunktion nach 20 min Ischämie ist das Ausmaß der morphologischen Veränderungen auffallend gering. Diese Erscheinung könnte zum Teil auf einem Auswertungsproblem beruhen: Hirnmitochondrien sind deutlich kleiner als die meisten Mitochondrien anderer Organe. Während ungeschädigte Mitochondrien trotzdem leicht von gleichgroßen anderen Zellorganellen oder Synaptosomen unterschieden werden können, besteht bei stark geschädigten Mitochondrien die Gefahr der Verwechslung. Es ist also denkbar, daß einige stark geschädigte Mitochondrien nicht als solche erkannt worden sind, und daß deshalb der Anteil der intakten Mitochondrien zu groß veranschlagt wurde. Die Anzahl derjenigen Gebilde, die möglicherweise "verkannte" Mitochondrien sind, ist aber so klein, daß der wahre Anteil der intakten Mitochondrien nach 20 min Ischämie allenfalls einige Prozentpunkte unter dem angegebenen Wert liegen kann. Der Unterschied zwischen dem Ausmaß des Funktionsverlustes (65%) und dem Ausmaß der morphologisch sichtbaren Schädigung (17%) nach 20 min Ischämie läßt sich mit dem genannten möglichen Auswertungsfehler nicht erklären. Die Diskrepanz beruht sehr wahrscheinlich darauf, daß die gemessenen Funktions-

parameter wesentlich empfindlicher sind und dadurch ischämische Schädigungen schneller und deutlicher anzeigen als morphologische Kriterien.

In der Literatur finden sich einige Arbeiten von Brierley et al. (20;21;22), die ischämische Zellveränderungen im Rattenhirn nach Art und Reihenfolge des Auftretens beschreiben. Als früheste Veränderung nennen sie das Anschwellen der Mitochondrien, dem später die Bildung von Vakuolen folgt. Diese Vakuolen stammen höchstwahrscheinlich von geschwollenen Mitochondrien. Leider ist ein quantitativer Vergleich der Ergebnisse nicht möglich, weil sich die Methoden insbesondere bei der Ischämieerzeugung zu stark unterscheiden.

Ikrenyi et al. (23) untersuchten Hirnmitochondrien elektronenmikroskopisch nach einer, vier und zwölf Stunden Ischämie bei 20 bis 22°C. Es werden zwei Mitochondrientypen unterschieden, solche mit dunkler Matrix und solche mit heller Matrix, letztere mit oder ohne Cristae. Da der Anteil der Mitochondrien mit heller Matrix im Verlauf der Ischämie stetig zunimmt, wird vermutet, daß diese ischämiebedingt aus jenen Mitochondrien mit dunkler Matrix entstehen. Nach einer Stunde Ischämie bei 20 bis 22°C ist der Befund nahezu unverändert im Vergleich mit den Kontrolluntersuchungen (ohne Ischämie). Nach zwölf Stunden Ischämie ist der Anteil der intakten Mitochondrien um 82 % gefallen. Ikrenyi vergleicht abschließend den Anteil der intakten Mitochondrien mit dem Atmungskontrollquotienten als funktionellem Parameter und findet, daß beide im Verlauf der Ischämie parallel zueinander abnehmen. Wegen der unterschiedlichen Ischämietemperatur ist ein Vergleich der Ergebnisse nur schwer möglich. Ein paralleles Abnehmen des Anteils intakter Mitochondrien

und des Atmungskontrollquotienten konnte bei den hier berichteten Ergebnissen nicht beobachtet werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß Hirn-mitochondrien nach 20 min Ischämie nur zu einem relativ geringen Teil morphologische Veränderungen zeigen. Die Funktionsverluste müssen also größtenteils bei morphologisch kaum veränderten Mitochondrien auftreten. Daraus ergibt sich, daß zur Erfassung von ischämisch bedingten Schädigungen funktionelle Untersuchungen empfindlicher und damit besser geeignet sind als morphologische Untersuchungen.

4.3 Diskussion der Versuche zur Auswirkung der Ischämie auf die Mitochondrienfunktion

Die Ergebnisse zeigen übereinstimmend für beide Substrate einen erheblichen Abfall der ATP-Bildungsraten auf ca. 35 % des Kontrollwertes innerhalb von 20 min Ischämie. Parallel dazu sank bei der Verwendung von Malat als Substrat der Atmungskontrollquotient von 3,24 (Kontrollwert) auf 1,31 nach 20 min Ischämie, was auf eine Verminderung des Sauerstoffverbrauchs in "state 3" zurückzuführen ist. Der Sauerstoffverbrauch in "state 4" war nur wenig verändert.

Bei der Verwendung von Succinat hingegen war der Abfall des Atmungskontrollquotienten nicht so stark ausgeprägt, was darauf zurückzuführen ist, daß in diesem Fall die Sauerstoffverbrauchsraten sowohl in "state 3" als auch in "state 4" kontinuierlich absanken. Hierbei muß noch folgendes erwähnt werden: Im Gegensatz zu den Versuchen mit Malat nahm bei der Verwendung von Succinat der Sauer-

stoffverbrauch nach der ADP-Zugabe nur allmählich zu. Diese Übergangsphase war bei den Kontrollversuchen (ohne Ischämie) nicht zu beobachten und wurde mit zunehmender Ischämiedauer länger (bis zu wenigen Minuten bei 20-minütiger Ischämie). Da zur Auswertung die Kurvenabschnitte mit zeitlich konstanten Verbrauchsraten in den einzelnen Zuständen verwendet wurden (vgl. Kapitel 2.4.5), wirkte sich die Übergangsphase auf die Ergebnisse nicht aus. Diese beobachtete Anpassungsphase kann durch Veränderungen der Transportraten von Succinat beim Übergang von "state 4" auf "state 3" bedingt sein.

Der P/O-Quotient konnte nur für die Kontrollversuche (ohne Ischämie) bestimmt werden, da mit zunehmender Ischämiedauer die Sauerstoffverbrauchsraten im "state 3" insbesondere bei Verwendung von Malat als Substrat sehr stark abnahmen. Dadurch wurde die Auswertung der Schreiberkurven zur Ermittlung der Differenz zwischen den Sauerstoffverbrauchsraten im aktivierten und kontrollierten Zustand erheblich erschwert. Diese methodische Schwierigkeit führt zur Unterschätzung des Sauerstoffnettoverbrauchs, einer Größe, die in den Nenner des P/O-Quotienten eingeht. Rein rechnerisch ergeben sich dadurch ansteigende P/O-Quotienten.

In der vorliegenden Arbeit wurden Hirnmitochondrien aus cerebralen Cortexabschnitten isoliert ohne weitere Differenzierung nach ihrer Herkunft aus Neuronen oder Gliazellen. Obwohl die Hirnrinde nur zu etwa einem Viertel aus Neuronen besteht, bestreiten diese drei Viertel des Sauerstoffverbrauchs (24). Es kann daher angenommen werden, daß die beobachteten ischämiebedingten Funktionsverluste im wesentlichen auf Schädigungen der neuronalen Mitochondrien zurückgehen (25;26).

Seit vielen Jahren ist bekannt, daß Narkotika die oxidative Phosphorylierung in Hirnmitochondrien beeinflussen können. Beispielsweise wurde beobachtet, daß der Sauerstoffverbrauch in "state 3" und der Atmungskontrollquotient herabgesetzt werden können. Dieser Effekt ist unter anderem abhängig von der Art und der Dosierung des Narkotikums sowie von dem verwendeten Atmungskettensubstrat (27;28). In Vorversuchen zu der vorliegenden Arbeit konnte bei hoch dosierter Äthernarkose ein Einfluß des Narkotikums auf die Sauerstoffverbrauchsraten gefunden werden. Um die Ergebnisse vergleichbar zu machen, wurde daher besondere Sorgfalt darauf verwendet, die Narkosebedingungen hinsichtlich Äthermenge und Einwirkungs-dauer in jedem Versuch so exakt wie möglich zu reproduzieren. Die bei den Kontrollversuchen ohne Ischämie erhaltenen P/O-Quotienten von 2,81 (Malat) bzw. 1,96 (Succinat) rechtfertigen die Annahme, daß die durchgeführte Äthernarkose die Atmungskettenphosphorylierung unter den angegebenen Versuchsbedingungen nicht nennenswert beeinträchtigte.

Wilhjelm et al. (29;30;31) untersuchten an Mäusen, ob Narkotika über den erwähnten Einfluß hinaus auch die Toleranz gegenüber Anoxie verändern können. In Abhängigkeit von dem gewählten Narkotikum ergaben sich recht unterschiedliche Ergebnisse: Die Verlängerung der Überlebenszeit schwankte zwischen +154,0 % und -9,4 %. Äther war unter zwölf untersuchten Narkotika das einzige, bei dem keine Veränderung der Überlebenszeit festgestellt werden konnte.

In der Literatur finden sich einige Arbeiten zur Funktion von Hirnmitochondrien in Abhängigkeit von der Ischämiedauer (23; 25; 32; 33; 34; 35). Leider sind die Ergebnisse im allgemeinen schwer vergleichbar, da von diesen Autoren

andere Versuchsbedingungen gewählt wurden, was die Meßwerte zum Teil erheblich beeinflussen kann.

Hierzu gehören:

- a) Art der Ischämie (komplett/inkomplett, Hirndruck),
- b) Temperatur während der Ischämie,
- c) Tierspezies (25),
- d) Verwendung verschiedener Narkotika und anderer Pharmaka,
- e) Präparationsverfahren (Bernard und Cockrell (3) weisen speziell darauf hin, daß durch den Präparationsschritt mit dem Ficoll-Dichtegradienten die Sauerstoffverbrauchsrate im "state 3" sowie die Atmungskontrollquotienten deutlich gesenkt werden),
- f) Versuchsbedingungen während der Sauerstoffmessung (besonders zu erwähnen sind hier neben der Temperatur die Konzentrationen verschiedener Ionen z.B. Kalium oder Magnesium (3), der Zusatz von Hilfsstoffen z.B. Rinderserumalbumin sowie das verwendete Atmungsketten-substrat).

Ozawa et al. (32) isolierten Hirnmitochondrien aus Ratten nach Ischämie durch Dekapitation. Bei einer Temperatur von 22°C fielen sowohl die Sauerstoffverbrauchsrate im "state 3" als auch die daraus berechneten ADP-Phosphorylierungsrate innerhalb von drei Minuten Ischämie übereinstimmend auf ein Drittel des Ausgangswertes. Das verwendete Substrat war Glutamat. Alle folgenden Autoren wählten eine Mischung aus Glutamat und Malat.

Schutz et al. (25) erzeugten eine Ischämie im Kaninchengehirn durch künstlich erhöhten intracraniellen Druck in Barbituratnarkose. Sie fanden ein Absinken des Atmungskontrollquotienten, das erst nach 30 min Ischämie signifikant ist und nach 40 min die Hälfte des Ausgangswertes erreicht hat. Die Autoren weisen ausdrücklich auf unter-

schiedliche Ergebnisse bei verschiedenen Tierspezies hin. In der gleichen Arbeit wird von morphologischen Untersuchungen an Rattenhirnmitochondrien durch J.B. Brierley berichtet, der die morphologischen Veränderungen nach 15 min Anoxie für irreversibel halte.

Ikrenyi et al. (23) dekapitierten Ratten und verwendeten eine Temperatur von 20 bis 22°C. Dabei zeigte sich nach 60 min Ischämie ein Abfall der Sauerstoffverbrauchsrate im "state 3" um nur 33 %. Der Sauerstoffverbrauch im "state 4" veränderte sich (ebenso wie bei den meisten anderen Autoren) in dieser Zeit nur relativ wenig.

Ginsberg et al. (33) untersuchten Hirnmitochondrien des mongolischen Gerbils (*Meriones unguiculatus*) nach Verschuß der Arteria carotis communis beiderseits in Urethane-Narkose. Sie gelangten dabei zu dem Ergebnis, daß gemessen an den Sauerstoffverbrauchsraten erst nach 60 min Ischämie eine deutliche Schädigung erkennbar wird.

Rehncrona et al. (34;35) erzeugten in Ratten eine Ischämie des Gehirns durch künstlich erhöhten intracraniellen Druck in Stickoxydulnarkose. Nach 30 min kompletter Ischämie waren der Sauerstoffverbrauch in "state 3", der Atmungskontrollquotient und die ATP-Bildungsrate auf die Hälfte abgesunken, der Sauerstoffverbrauch in "state 4" kaum verändert (Substrat: Malat).

Bei Verwendung von Succinat als Substrat (übrige Bedingungen unverändert) fiel der Sauerstoffverbrauch in "state 3" nur auf 60 % des Ausgangswertes während gleichzeitig auch der Sauerstoffverbrauch in "state 4" leicht abnahm. Daraus resultierte für den Atmungskontrollquotienten ein wesentlich schwächerer Abfall, als bei der Verwendung von Malat.

Über die berichteten Ergebnisse hinaus untersuchten Rehnrcrona et al. die Mitochondrienfunktion nach 30 min kompletter Ischämie und anschließend 30 min Regeneration in vivo sowie die Auswirkung von inkompletter Ischämie und die Regenerationsfähigkeit. Dabei zeigte sich, daß nach 30 min kompletter Ischämie eine weitgehende Regeneration der Mitochondrienfunktion in vivo möglich ist, während nach inkompletter Ischämie eine solche Regeneration nicht beobachtet wurde.

Bei gut vergleichbaren Versuchsbedingungen sind die Angaben der letztgenannten Autoren in guter Übereinstimmung mit den hier berichteten Ergebnissen, die unabhängig von einander zu etwa der gleichen Zeit erhalten wurden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die Funktion der Hirnmitochondrien bereits nach ca. 10 min Ischämie erheblich eingeschränkt ist: Der Funktionsverlust äußert sich in einer annähernd parallel verlaufenden Abnahme der Sauerstoffverbrauchsrate im "state 3" und der ATP-Bildungsrate (Abb.3), während die Sauerstoffverbrauchsrate im "state 4" sich nicht wesentlich verändert. Daraus kann der Schluß gezogen werden, daß die Ischämie nicht zur Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung führt. Die innere Mitochondrienmembran bleibt also trotz Ischämie so intakt, daß die Ausbildung eines Protonengradienten möglich ist. Der ischämiebedingte Funktionsverlust der Mitochondrien muß daher auf einer Schädigung des Elektronentransportsystems (Atmungskette) oder des ATP synthetisierenden Systems beruhen.

Mit den vorliegenden Ergebnissen kann jedoch nicht unterschieden werden, ob Ischämie zu einem kompletten funktionellen Ausfall eines gewissen Prozentsatzes der Mitochondrien führt, während der andere Teil völlig intakt bleibt, oder ob alle Mitochondrien partiell geschädigt

werden. Auch läßt sich nicht entscheiden, ob die mitochondrialen Funktionsstörungen reversibel oder irreversibel sind.

Auf jeden Fall weisen die Versuchsergebnisse aber darauf hin, daß Hirnmitochondrien besonders empfindlich gegenüber einer Unterbrechung der Blutzufuhr sind, was auch zeitlich gut mit den klinischen Erfahrungen bezüglich der irreversiblen Hirnschädigung übereinstimmt.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung einer durch Herzschnitt hervorgerufenen Ischämie bei 37°C auf die Funktion von Hirnmitochondrien bei Ratten untersucht. Als Parameter einer ischämisch bedingten funktionellen Schädigung dienten Sauerstoffverbrauchsraten und ATP-Bildungsraten. Als Substrate für die Atmungskette wurden Malat und Succinat verwendet. Die untersuchten Ischämiezeiten waren 0 min, 5 min, 10 min und 20 min.

Zur Erfassung von ischämiebedingten morphologischen Veränderungen wurden Mitochondrienfraktionen nach 0 min und nach 20 min Ischämie elektronenmikroskopisch untersucht.

Zusätzlich wurden unter den gleichen Bedingungen die Konzentrationen der Adeninnukleotide (ATP, ADP und AMP) im Gehirn bestimmt und daraus der "Energy charge" als Ausdruck des energetischen Zustandes des Gehirns berechnet.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Während der ersten fünf Ischämie Minuten werden im Rattenhirn die ATP-Vorräte fast vollständig und die ADP-Vorräte zu über 60 % abgebaut, was mit einem Absinken des "Energy charge" von 0,687 auf 0,098 einhergeht. Im weiteren Verlauf der Ischämie fallen die Konzentrationen aller drei Adeninnukleotide langsam und gleichmäßig ab, was darauf hinweist, daß über die Spaltung der energiereichen Phosphorsäureanhydridbindungen hinaus das Adeninnukleotidmolekül abgebaut wird.
2. Im elektronenmikroskopischen Bild sinkt der Anteil der intakten Mitochondrien von 94 % (Ausgangswert) auf 83 % nach 20 min Ischämie.

3. Hinsichtlich der Mitochondrienfunktion zeigen die Ergebnisse übereinstimmend für beide Substrate einen Abfall der ATP-Bildungsraten auf ca. 35 % des Ausgangswertes innerhalb von 20 min Ischämie. Gleichzeitig fällt der Atmungskontrollquotient bei der Verwendung von Malat von 3,24 (Ausgangswert) auf 1,31 und bei der Verwendung von Succinat von 2,42 (Ausgangswert) auf 1,74.

Die annähernd gleichmäßige Abnahme der Sauerstoffverbrauchs- und ATP-Bildungsraten im Verlauf der Ischämie zeigt, daß primär der Elektronentransport und nicht die ATP-Synthese beeinträchtigt wird.

Die Ergebnisse zeigen, daß zur Erfassung ischämisch bedingter Schädigungen funktionelle Untersuchungen empfindlicher und damit geeigneter sind als morphologische Kriterien. Die Ergebnisse der Mitochondrienversuche werden im Hinblick auf die Energieversorgung des Gehirns und die damit im Zusammenhang stehende klinisch bekannte Empfindlichkeit dieses Organs gegenüber Ischämie diskutiert.

6. A P P E N D I X

Tabellen der einzelnen Versuchsergebnisse

Mitochondrienfunktion

nach 0 min, 5 min, 10 min und 20 min Ischämie

mit den Substraten Malat und Succinat

Sauerstoffverbrauchsrate in "state 3" und "state 4"

ATP-Bildungsrate

Atmungskontrollquotienten

P/O-Quotienten (nur für 0 min)

Adeninnukleotidkonzentrationen

nach 0 min, 5 min, 10 min und 20 min Ischämie

ATP

ADP

AMP

Summe aus ATP, ADP und AMP

"Energy charge"

Versuch Nr.	Sauerstoffverbr.		P/O	RCR	ATP-Bildung
	"state 4"	"state 3"			
1	17,5	53,4	2,66	3,05	190,7
2	15,0	49,0	2,74	3,27	186,3
3	19,8	65,0	2,86	3,29	258,6
4	15,3	47,3	2,80	3,09	179,2
5	16,8	57,7	2,80	3,45	228,7
6	16,1	53,3	2,99	3,30	222,3
Mittelw.	16,8	54,3	2,81	3,24	211,0
SD	1,8	6,4	0,11	0,15	30,8

Tabelle 1a

SAUERSTOFFVERBRAUCHSRATEN, ATP-BILDUNGSRATEN,
ATMUNGSKONTROLLQUOTIENTEN UND P/O-QUOTIENTEN
VON MITOCHONDRIEN AUS RATTENHIRNEN

Substrat: Malat Ischämie: 0 min 37°C

Alle Tabellenwerte stellen Mittelwerte aus jeweils zwei Messungen mit der selben Mitochondrienpräparation dar, mit der auch der korrespondierende Versuch mit dem Substrat Succinat durchgeführt worden ist.

Sauerstoffverbrauchsdaten und ATP-Bildungsdaten sind in nmol pro Minute und mg Mitochondrienprotein angegeben.

Versuch Nr.	Sauerstoffverbr.		P/O	RCR	ATP-Bildung
	"state 4"	"state 3"			
1	25,5	59,8	1,86	2,34	127,1
2	24,6	60,9	1,84	2,49	133,6
3	34,4	82,5	1,99	2,40	190,8
4	31,9	82,7	1,93	2,60	195,6
5	34,1	78,4	2,08	2,30	183,7
6	33,2	78,4	2,03	2,37	183,3
Mittelw.	30,6	73,8	1,96	2,42	169,0
SD	4,4	10,6	0,10	0,11	30,4

Tabelle 2a

SAUERSTOFFVERBRAUCHSRATEN, ATP-BILDUNGSRATEN,
ATMUNGSKONTROLLQUOTIENTEN UND P/O-QUOTIENTEN
VON MITOCHONDRIEN AUS RATTENHIRNEN

Substrat: Succinat Ischämie: 0 min 37°C

Alle Tabellenwerte stellen Mittelwerte aus jeweils zwei Messungen mit der selben Mitochondrienpräparation dar, mit der auch der korrespondierende Versuch mit dem Substrat Malat durchgeführt worden ist.

Sauerstoffverbrauchsdaten und ATP-Bildungsdaten sind in nmol pro Minute und mg Mitochondrienprotein angegeben.

Versuch Nr.	Sauerstoffverbr.		RCR	ATP-Bildung
	"state 4"	"state 3"		
1	25,6	47,6	1,88	147,4
2	20,3	39,9	1,99	120,0
3	19,7	37,7	1,93	117,6
4	21,5	42,9	1,99	138,1
5	20,8	39,9	1,93	111,6
6	21,1	45,4	2,06	148,6
Mittelwert	21,5	42,2	1,96	130,6
SD	2,1	3,8	0,06	16,2

Tabelle 3a

SAUERSTOFFVERBRAUCHSRATEN, ATP-BILDUNGSRATEN
UND ATMUNGSKONTROLLQUOTIENTEN
VON MITOCHONDRIEN AUS RATTENHIRNEN

Substrat: Malat Ischämie: 5 min 37°C

Alle Tabellenwerte stellen Mittelwerte aus jeweils zwei Messungen mit der selben Mitochondrienpräparation dar, mit der auch der korrespondierende Versuch mit dem Substrat Succinat durchgeführt worden ist.

Sauerstoffverbrauchsrate und ATP-Bildungsrate sind in nmol pro Minute und mg Mitochondrienprotein angegeben.

Versuch Nr.	Sauerstoffverbr.		RCR	ATP-Bildung
	"state 4"	"state 3"		
1	35,5	81,7	2,31	115,5
2	31,2	73,7	2,39	113,0
3	31,4	66,9	2,14	105,2
4	31,8	70,5	2,22	114,6
5	29,7	66,3	2,24	121,1
6	33,1	70,7	2,14	131,8
Mittelwert	32,1	71,6	2,24	116,9
SD	2,0	5,6	0,10	8,9

Tabelle 4a

SAUERSTOFFVERBRAUCHSRATEN, ATP-BILDUNGSRATEN
UND ATMUNGSKONTROLLQUOTIENTEN
VON MITOCHONDRIEN AUS RATTENHIRNEN

Substrat: Succinat Ischämie: 5 min 37°C

Alle Tabellenwerte stellen Mittelwerte aus jeweils zwei Messungen mit der selben Mitochondrienpräparation dar, mit der auch der korrespondierende Versuch mit dem Substrat Malat durchgeführt worden ist.

Sauerstoffverbrauchsrate und ATP-Bildungsrate sind in nmol pro Minute und mg Mitochondrienprotein angegeben.

Versuch Nr.	Sauerstoffverbr.		RCR	ATP-Bildung
	"state 4"	"state 3"		
1	23,6	35,3	1,50	115,3
2	26,3	35,9	1,36	105,1
3	19,1	28,5	1,50	85,7
4	15,9	27,8	1,75	89,6
5	22,0	35,7	1,63	122,4
6	21,1	33,5	1,59	113,0
Mittelwert	21,3	32,8	1,56	105,2
SD	3,6	3,7	0,13	14,7

Tabelle 5a

SAUERSTOFFVERBRAUCHSRATEN, ATP-BILDUNGSRATEN
UND ATMUNGSKONTROLLQUOTIENTEN
VON MITOCHONDRIEN AUS RATTENHIRNEN

Substrat: Malat Ischämie: 10 min 37°C

Alle Tabellenwerte stellen Mittelwerte aus jeweils zwei Messungen mit der selben Mitochondrienpräparation dar, mit der auch der korrespondierende Versuch mit dem Substrat Succinat durchgeführt worden ist.

Sauerstoffverbrauchsrate und ATP-Bildungsrate sind in nmol pro Minute und mg Mitochondrienprotein angegeben.

Versuch Nr.	Sauerstoffverbr.		RCR	ATP-Bildung
	"state 4"	"state 3"		
1	19,9	45,9	2,36	76,9
2	23,5	46,4	1,97	60,9
3	22,0	50,4	2,33	77,4
4	23,4	47,8	2,05	78,9
5	29,6	57,7	1,95	106,3
6	28,5	66,1	2,33	106,5
Mittelwert	24,5	52,4	2,17	84,5
SD	3,8	8,0	0,19	18,2

Tabelle 6a

SAUERSTOFFVERBRAUCHSRATEN, ATP-BILDUNGSRATEN
UND ATMUNGSKONTROLLQUOTIENTEN
VON MITOCHONDRIEN AUS RATTENHIRNEN

Substrat: Succinat Ischämie: 10 min 37°C

Alle Tabellenwerte stellen Mittelwerte aus jeweils zwei Messungen mit der selben Mitochondrienpräparation dar, mit der auch der korrespondierende Versuch mit dem Substrat Malat durchgeführt worden ist.

Sauerstoffverbrauchsdaten und ATP-Bildungsdaten sind in nmol pro Minute und mg Mitochondrienprotein angegeben.

Verfahren	Stichtag: 1.1.2017		Zusatz	Kontrollsumme
	Verfahren 1	Verfahren 2		
1	10,0	10,0	1,0	10,0
2	10,0	10,0	1,0	10,0
3	10,0	10,0	1,0	10,0
4	10,0	10,0	1,0	10,0
5	10,0	10,0	1,0	10,0
6	10,0	10,0	1,0	10,0
Summe	60,0	60,0	6,0	66,0
SD	10,0	10,0	1,0	10,0

Table 1

Table 1 shows the results of the first two experiments.

Table 1 shows the results of the first two experiments.

Table 1 shows the results of the first two experiments.

Table 1 shows the results of the first two experiments.

The first two experiments show that the results are not significantly different from the control group. The results of the first two experiments are not significantly different from the control group.

The results of the first two experiments are not significantly different from the control group.

Versuch Nr.	Sauerstoffverbr.		RCR	ATP-Bildung
	"state 4"	"state 3"		
1	21,9	39,7	1,81	64,3
2	23,4	36,5	1,57	47,1
3	22,6	36,2	1,60	50,6
4	25,0	46,5	1,86	61,3
5	19,5	36,5	1,87	53,5
6	29,9	51,4	1,72	75,3
Mittelwert	23,7	41,1	1,74	58,7
SD	3,5	6,4	0,13	10,4

Tabelle 8a

SAUERSTOFFVERBRAUCHSRATEN, ATP-BILDUNGSRATEN
UND ATMUNGSKONTROLLQUOTIENTEN
VON MITOCHONDRIEN AUS RATTENHIRNEN

Substrat: Succinat Ischämie: 20 min 37°C

Alle Tabellenwerte stellen Mittelwerte aus jeweils zwei Messungen mit der selben Mitochondrienpräparation dar, mit der auch der korrespondierende Versuch mit dem Substrat Malat durchgeführt worden ist.

Sauerstoffverbrauchsrate und ATP-Bildungsrate sind in nmol pro Minute und mg Mitochondrienprotein angegeben.

Versuch Nr.	ATP	ADP	AMP	Summe	"Energy charge"
1	1296	983	383	2662	0,671
2	1517	809	355	2681	0,717
3	1389	859	317	2565	0,709
4	1303	737	353	2393	0,698
5	1242	1028	390	2660	0,660
6	1287	896	429	2612	0,664
Mittelw.	1339	885	371	2596	0,687
SD	99	108	38	108	0,025

Tabelle 9a

ADENINNUKLEOTIDKONZENTRATIONEN UND "ENERGY CHARGE"

IM RATTENHIRN NACH 0,4 min ISCHÄMIE

Die einzelnen Tabellenwerte für ATP, ADP und AMP stellen Mittelwerte aus jeweils mindestens zwei photometrischen Bestimmungen der selben Konzentration dar.

Die Nukleotidkonzentrationen sind in nmol pro Gramm Frischgewicht angegeben.

Versuch Nr.	ATP	ADP	AMP	Summe	"Energy charge"
1	16	315	1565	1896	0,092
2	37	353	1523	1913	0,112
3	24	288	1669	1981	0,085
4	26	328	1526	1880	0,101
Mittelw.	26	321	1571	1918	0,098
SD	7	27	68	44	0,012

Tabelle 10a

ADENINNUKLEOTIDKONZENTRATIONEN UND "ENERGY CHARGE"

IM RATTEHIRN NACH 5 min ISCHAMIE

Die einzelnen Tabellenwerte für ATP, ADP und AMP stellen Mittelwerte aus jeweils mindestens zwei photometrischen Bestimmungen der selben Konzentration dar.

Die Nukleotidkonzentrationen sind in nmol pro Gramm Frischgewicht angegeben.

Versuch Nr.	ATP	ADP	AMP	Summe	"Energy charge"
1	21	274	1333	1628	0,097
2	33	321	1347	1701	0,114
3	16	250	1328	1594	0,088
4	17	253	1303	1573	0,091
5	21	253	1226	1500	0,098
6	20	270	1477	1767	0,088
Mittelw.	21	270	1336	1627	0,096
SD	6	27	82	95	0,010

Tabelle 11a

ADENINNUKLEOTIDKONZENTRATIONEN UND "ENERGY CHARGE"

IM RATTENHIRN NACH 10 min ISCHÄMIE

Die einzelnen Tabellenwerte für ATP, ADP und AMP stellen Mittelwerte aus jeweils mindestens zwei photometrischen Bestimmungen der selben Konzentration dar.

Die Nukleotidkonzentrationen sind in nmol pro Gramm Frischgewicht angegeben.

Versuch Nr.	ATP	ADP	AMP	Summe	"Energy charge"
1	7	242	1103	1352	0,095
2	9	229	1055	1293	0,096
3	33	207	1171	1381	0,077
4	15	201	1042	1258	0,092
Mittelw.	9	220	1093	1321	0,090
SD	5	19	58	56	0,009

Tabelle 12a

ADENINNUKLEOTIDKONZENTRATIONEN UND "ENERGY CHARGE"

IM RATTENHIRN NACH 20 min ISCHÄMIE

Die einzelnen Tabellenwerte für ATP, ADP und AMP stellen Mittelwerte aus jeweils mindestens zwei photometrischen Bestimmungen der selben Konzentration dar.

Die Nukleotidkonzentrationen sind in nmol pro Gramm Frischgewicht angegeben.

7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie, hrsg. M.Eder und P.Gedigk, 30.Auflage (Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 1977), S. 92-93
2. John M. Land et al., "Development of Mitochondrial Energy Metabolism in Rat Brain", Biochem. J., 164 (1977), 339 - 348
3. P.A. Bernard, R.S. Cockrell, "The Respiration of Brain Mitochondria and its Regulation by Monovalent Cation Transport", Biochimica et Biophysica Acta, 548 (1979), 173 - 186
4. E.S. Flamm et al., "Free Radicals in Cerebral Ischemia", Stroke Vol.9, No.5 (1978), 445 - 447
5. J.D. Butterfield, C.P. McGraw, "Free Radical Pathology", Stroke Vol.9, No.5 (1978), 443 - 445
6. O.H. Lowry et al., "Effect of Ischemia on Known Substrates and Cofactors of the Glycolytic Pathway in Brain", J. Biol. Chem., Vol. 239, No.1 (1964), 18 - 30
7. N.D. Goldberg, J.V. Passonneau, O.H. Lowry, "Effects of Changes in Brain Metabolism on the Levels of Citric Acid Cycle Intermediates", J. Biol. Chem., Vol. 241, No. 17 (1966), 3997 - 4003
8. J.B. Clark, W.J. Nicklas, "The Metabolism of Rat Brain Mitochondria", J. Biol. Chem., Vol. 245, No. 18 (1970), 4724 - 4731
9. B. Chance, G.R. Williams, "Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation: III. The Steady State", J. Biol. Chem., Vol. 217 (1955), 409 - 427

10. G.A. Truesdale, A.L. Downing, "Solubility of Oxygen in Water", *Nature*, Vol. 173 (1954), 1236
11. H.A. Harper et al., *Physiologische Chemie* (Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 1975), S. 271
12. Peter Karlson, *Kurzes Lehrbuch der Biochemie*, 10. Aufl. (Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1977), S. 176
13. T.E. Weichselbaum, "An Accurate and Rapid Method for the Determination of Proteins in Small Amounts of Blood Serum and Plasma", *Amer. J. Clin. Path.*, 10 (1946), 40 - 49
14. Y. Kamiyama, K. Ozawa, I. Honjo, "Changes in Mitochondrial Phosphorylative Activity and Adenylate Energy Charge of Regenerating Rabbit Liver", *J. Biochem.*, Vol. 80, No.4 (1976), 875 - 881
15. A. Wollenberger, O. Ristau, G. Schoffa, "Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung größerer Gewebestücke", *Pflügers Archiv ges. Physiol.*, 270 (1960), 399 - 412
16. Lothar Sachs, *Angewandte Statistik*, 4. Auflage (Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 1974)
17. B. Deuticke, E. Gerlach, R. Dierkesmann, "Abbau freier Nucleotide in Herz, Skelettmuskel [sic], Gehirn und Leber der Ratte bei Sauerstoffmangel", *Pflügers Archiv ges. Physiol.*, 292 (1966), 239 - 254
18. D.E. Levy, T.E. Duffy, "Effect of Ischemia on Energy Metabolism in the Gerbil Cerebral Cortex", *J. of Neurochemistry*, Vol. 24 (1975), 1287 - 1289
19. B. Ljunggren, H. Schutz, B.K. Siesjö, "Changes in Energy State and Acid-Base Parameters of the Rat Brain during Complete Compression Ischemia", *Brain Research*, 73 (1974), 277 - 289

20. A.W. Brown, J.B. Brierley, "The Nature and Time Course of Anoxic-ischemic Cell Change in the Rat Brain. An Optical and Electron Microscope Study", Brain Hypoxia, ed. J.B. Brierley, B.S. Meldrum (London: Heinemann, 1971), 49 - 60
21. S.M. McGee-Russell, A.W. Brown, J.B. Brierley, "A Combined Light and Electron Microscope Study of Early Anoxic-ischemic Cell Change in Rat Brain", Brain Research, 20 (1970), 193 - 200
22. J.B. Brierley, "Pathology of Cerebral Ischemia", Cerebral Vascular Diseases, Eighth Conference, ed. F.H. McDowell, R.W. Brennan (New York London: Grune & Stratton, 1973), 59 - 75
23. K. Ikrényi et al., "Metabolic and Electron Microscopic Studies post mortem in Brain Mitochondria", Adv. Exp. Med. Biol., 75 (1976), 159 - 164
24. S.R. Korey, M. Orchen, "Relative Respiration of Neuronal and Glial Cells", J. of Neurochem., Vol.3 (1959), 277 - 285
25. H. Schutz et al., "Brain Mitochondrial Function after Ischemia and Hypoxia", Arch. Neurol., Vol. 29 (1973), 408 - 416
26. B. Nilsson, K. Norberg, K. Siesjö, "Biochemical Events in Cerebral Ischemia", Br. J. Anaesth., 47 (1975), 751 - 760
27. P.J. Cohen, "Effect of Anesthetics on Mitochondrial Function", Anesthesiology, Vol. 39, No.2 (1973), 153 - 164
28. P.J. Cohen, R. McIntyre, "The Effects of General Anesthesia on Respiratory Control and Oxygen Consumption of Rat Liver Mitochondria", Cellular Biology and Toxicity of Anesthetics, ed. B.R. Fink (Baltimore 1972), 109 - 116

29. O. Secher, B. Wilhjelm, "The Protective Action of Anaesthetics against Hypoxia", *Can. Anaes. Soc. J.*, Vol. 15, No.5 (1968), 423 - 440
30. B. Wilhjelm, I. Arnfred, "Protective Action of some Anaesthetics against Anoxia", *Acta pharmacol. et toxicol.*, 22 (1965), 93 - 98
31. B. Wilhjelm, "Further Investigations into the Protective Action of Anaesthetics against Anoxia in Mice", *Acta pharmacol. et toxicol.*, 22 (1965), 131 - 134
32. K. Ozawa et al., "The Effect of Ischemia on Mitochondrial Metabolism", *J. of Biochemistry*, Vol. 61, No.4 (1967), 512 - 514
33. M.D. Ginsberg et al., "Mitochondrial Metabolism Following Bilateral Cerebral Ischemia in the Gerbil", *Annals of Neurology*, 1 (1977), 519 - 527
34. L. Mela, S. Rehncrona, "Brain Mitochondrial Function in Transient Complete and Incomplete Ischemia", *Federation Proceedings Abstracts*, Vol. 37, No. 3 (1978), 1496
35. S. Rehncrona, L. Mela, K. Siesjö, "Recovery of Brain Mitochondrial Function in the Rat after Complete and Incomplete Cerebral Ischemia", *Stroke*, Vol. 10, No.4 (1979), 437 - 446

Herrn Professor Dr. Karl Brand danke ich für die Überlassung des Themas, für die methodische Einarbeitung und für die stetige Betreuung bei der Durchführung und Auswertung der Versuche. Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für ihre freundliche Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Drecol-Lütjen vom Institut für Anatomie der Universität Erlangen-Nürnberg für die Erstellung und Beurteilung der elektronenmikroskopischen Befunde. Herrn Diplom-mathematiker Dr. habil. W. Gunselmann vom Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation danke ich für seine Beratung bei der statistischen Auswertung.

LEBENS LAUF

Name: Rolf Nitsche

Geburtstag: 24.1.56

Geburtsort: Ansbach

Eltern: Bodo Nitsche, Schulamtsdirektor
Else Nitsche, geb. Roth, Oberlehrerin

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1962 - 1966 Grundschule in 8802 Lehrberg
1966 - 1975 Platen-Gymnasium-Ansbach
(math.-naturwissenschaftlich)
1975 Abitur

Zivildienst: Juni 75 bis Sept. 76

Medizinstudium: seit dem WS 1976/77 an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
Aug. 78 Ärztliche Vorprüfung
März 80 1. Abschnitt der Ärztl. Prüfung
Aug. 82 2. Abschnitt der Ärztl. Prüfung
Okt. 83 3. Abschnitt der Ärztl. Prüfung
Nov. 83 Mündliches Examen
Dez. 83 Approbation als Arzt

